



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ miR-140 ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ»

ΠΑΠΑΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΛΙΚΗ-ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.....(**Επιβλέπουσα**)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.....(**Μέλος**)

ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής ΕΚΠΑ..... (**Μέλος**)

ΛΑΡΙΣΑ, 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

«THE ROLE OF miR-140 IN OSTEOARTHRITIS»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ: ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	6
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	8
1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	8
1.4 ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ	9
1.4.1 ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ	9
1.4.2 ΔΟΜΗ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	12
1.5 ΕΚΦΥΛΙΣΜΟΣ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΚΑΙ ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	15
1.6 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ: ΕΝΑ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟ ΝΟΣΗΜΑ	18
1.6.1 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	18
1.6.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ	19
1.6.3 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	21
1.7 ΤΑ Micro-RNAs	23
1.7.1 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ Micro-RNAs	24
1.7.2 ΤΑ Micro-RNAs ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	26
1.8 ΤΟ Micro-RNA 140	27
1.8.1 ΤΟ miR-140 ΣΤΗ ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ	28
1.8.2 ΤΟ miR-140 ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ	28
1.9 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ SNPs ΚΑΙ Micro-RNAs	30
2. ΣΚΟΠΟΣ	34
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	35
3.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	36
3.2.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	36
3.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	37
3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΑΡΘΡΩΣΗΣ	38
3.3.1 ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ RNA	38
3.3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ RNA	39
3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)	40
3.4.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (1ος κύκλος)	40
3.4.2 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (2ος κύκλος)	40
3.4.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA	40

3.5 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real time PCR)	41
3.5.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ real-time PCR	42
3.5.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ U6 & miR-140	42
3.6 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΕΥΡΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ ΤΟ miR-140	43
3.7 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ Micro-RNAs	43
3.7.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ miR-140 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	44
3.7.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ miR-140 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	44
3.8 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA) ΓΙΑ ΤΑ BMP-2 & HDAC4	45
3.8.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA	45
3.8.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA	45
3.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BMP-2 & HDAC4 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real-time PCR)	47
3.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	47
3.10.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA	48
3.11 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ (ALLELIC DISCRIMINATION Assay, AD) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ TaqMan® Probes	49
3.11.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ AD Assay	50
3.11.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ AD Assay ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ miR-SNP rs7205289 (C>A) ΓΙΑ ΤΟ miR-140	50
3.12 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	50
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-140 ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΥΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗΝΙΣΚΟΥ	52
4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BMP-2 ΚΑΙ HDAC4 ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ miR-140 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	53
4.3 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ miR-SNP rs7205289 (C>A) ΤΟΥ miR-140	56
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια του Ακαδημαϊκού έτους 2015-2016, με επιβλέπουσα καθηγήτρια την Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κα. Ασπασία Τσέζου.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου σε όλους όσους με τίμησαν με τη συνεισφορά τους και την πολύτιμη βοήθεια τους στα πλαίσια της ολοκλήρωσης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου οφείλω στην καθηγήτρια μου κα. Τσέζου Ασπασία για την ανάθεση της παρούσας εργασίας, την άψογη συνεργασία που μου παρείχε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ως μέλος της εργαστηριακής της ομάδας. Θα ήθελα, επίσης, να την ευχαριστήσω θερμά για την κατανόηση και την εύστοχη καθοδήγηση της σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυψε στα πλαίσια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, και τέλος, για το γεγονός ότι αποτέλεσε πηγή έμπνευσης προκειμένου να βελτιώσω τις δυνατότητες μου σε κάθε επίπεδο.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα. Βαρβάρα Τραχανά, καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής του ΕΚΠΑ κα. Μαρία Τζέτη, για την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους συναδέλφους μου, με τους οποίους μοιράστηκα τον εργαστηριακό χώρο, για την υποστήριξη και την επικοινωνιακή συνεργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Παπαθανασίου Ιωάννα και την κα. Μουρμούρα Ευανθία για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια τους, κυρίως στα πλαίσια διεκπεραίωσης του πειραματικού σκέλους της παρούσας ερευνητικής μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχε αλλά και για την υπομονή που υπέδειξε κατά την διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (OA) αποτελεί την πιο κοινή νόσο του μυοσκελετικού συστήματος, με πολυπαραγοντική αιτιολογία. Ο εκφυλισμός του χόνδρου αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό μιας OA άρθρωσης με τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (miRNAs) να παίζουν κύριο ρόλο στην διαταραχή της ομοιοστασίας του. Μεταξύ αυτών, το miR-140 φαίνεται να εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμβάλλουν στην αύξηση της καταβολικής δράσης των OA χονδροκυττάρων. Στόχο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του miR-140 στην OA.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα αρθρικού χόνδρου, υμένα και μηνίσκου ασθενών με πρωτοπαθή OA, ενώ 10 φυσιολογικά άτομα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Τα δείγματα καλλιεργήθηκαν στο εργαστήριο και ακολούθησε απομόνωση RNA και ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του miR-140 με τη μέθοδο της real-time PCR. Στη συνέχεια, έγινε επιμόλυνση των OA χονδροκυττάρων με το miR-140, και κατόπιν αναζήτησης γονιδίων-στόχων του με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης -με real-time PCR- δύο εξ αυτών, της μορφογενετικής πρωτεΐνης των οστών-2 (BMP-2) και της απο-ακετυλάσης των ιστονών 4 (HDAC4), που συμμετέχουν στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Τέλος, μελετήθηκε ο ρόλος του πολυμορφισμού SNP rs7205289 (C>A) του miR-140 στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-140. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από 739 φυσιολογικά και 965 OA δείγματα περιφερικού αίματος και γονοτύπηση αυτών με τη μέθοδο διαχωρισμού των αλληλομόρφων.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων BMP-2 και HDAC4 μετά τη χορήγηση του miR-140 σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων. Τέλος, από τη γονοτύπηση για το επιλεγμένο SNP rs7205289 (C>A) του miR-140, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του σπάνιου αλληλίου A με την εκδήλωση του OA φαινοτύπου.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το miR-140 παρουσιάζει ιστο-ειδικότητα και μειωμένη έκφραση στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων BMP-2 και HDAC4, προτείνοντας τον ρόλο του στην παθογένεια της OA μέσω της ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων. Τέλος, το miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140 δεν αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της έκφρασης του εν λόγω miRNA, υποδηλώνοντας ότι η διαφοροποιημένη έκφραση του miR-140 στην OA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο άλλων μοριακών μηχανισμών.

ABSTRACT

Osteoarthritis is one of the most common and highly prevalent types of arthritis, also considered as a multifactorial disease. The degradation of articular cartilage is the main characteristic of joint pathology, whilst miRNAs are novel regulators of cartilage homeostasis' disruption. Amongst them, miR-140 has been reported to play a significant role in regulating the expression of several genes associated with OA chondrocytes' catabolic activity. The aim of this Master's thesis was to investigate the functional role of miR-140 in OA pathogenesis.

Cell cultures of 20 OA cartilage, synovium and meniscus samples, as well as 10 samples from individuals without OA were used for RNA extraction, followed by quantification of miR-140 expression, with real-time PCR. OA chondrocytes were maintained in 6-well plates, following treatment with miR-140. Using prediction algorithms for miR-140 gene-targets identification, two gene-targets were chosen (BMP-2 and HDAC4) due to their reported involvement in endochondral ossification. Real-time PCR was performed to determine their expression levels after miR-140 treatment. In addition DNA was extracted from 739 normal and 965 OA peripheral blood samples, and phenotype analysis for miR-SNP rs7205289 (C>A) was performed using the allelic discrimination assay (TaqMan; Applied Biosystems) to address the regulatory role of the particular miR-SNP in miR-140 expression and/or maturation.

It was shown that miR-140 expression was significantly reduced in OA chondrocytes, compared to normal. MiR-140 treatment in OA chondrocyte resulted in significant reduction of BMP-2 and HDAC4 mRNA expression levels. The results from the genotyping for miR-SNP rs7205289 (C>A) showed that there was no difference in minor allele frequency between patients and controls.

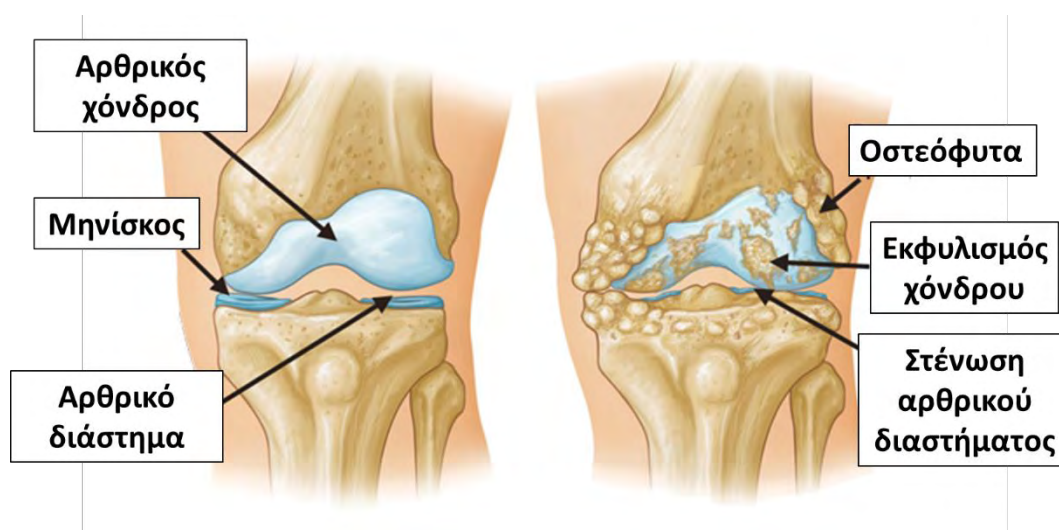
In conclusion, miR-140 is a cartilage-specific miRNA that is down-regulated in OA chondrocytes. It, also, targets BMP-2 and HDAC4, suggesting that miR-140 plays an important role in OA pathogenesis through regulation of the expression of genes involved in the chondrogenic differentiation processes. Furthermore, miR-SNP rs7205289 (C>A), located in pre-miR-140, does not contribute to OA susceptibility by influencing the processing of miR-140, suggesting that miR-140 expression levels may be regulated by other SNPs and/or molecular mechanisms.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ: ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) έχει χαρακτηριστεί ως η πιο κοινή, ευρέως διαδεδομένη και προοδευτικά εξελισσόμενη νόσος του μυοσκελετικού συστήματος, στις αναπτυγμένες χώρες παγκοσμίως (Arden N. and Nevitt M., 2006). Για την ακρίβεια, πρόκειται για μία χρόνια μορφής αρθρίτιδα με πολύπλοκη συμπτωματολογία, η οποία αποτελεί -μαζί με τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και την οστεοπόρωση- μία από τις τρεις παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος με τη μεγαλύτερη επίπτωση στον πληθυσμό. Τα συνεχώς αυξανόμενα ποσοστά επιπολασμού σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αποτελεί κύρια αιτία πρόκλησης πόνου και αναπηρίας κατά την κίνηση στους ενήλικους, καθιστά την ΟΑ μείζον πρόβλημα υγείας, με ισχυρό κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο τόσο στην πολιτεία, όσο και στην ποιότητα ζωής των ασθενών (Zhang Y. et al., 2010).

Η ΟΑ συνεπιφέρει ένα σύνολο διαταραχών που είναι δυνατό να πλήξουν οποιαδήποτε άρθρωση του ανθρώπινου σώματος. Ωστόσο, φαίνεται πως αρθρώσεις όπως εκείνες του γόνατος, του ισχίου, του χεριού και της σπονδυλικής στήλης βλάπτονται με μεγαλύτερη συχνότητα (Grazio S. et al, 2009). Οι προσβεβλημένες αρθρώσεις εμφανίζουν ορισμένα καλά χαρακτηρισμένα παθοφυσιολογικά ευρήματα, με πιο χαρακτηριστικό τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, ο οποίος καλύπτει την επιφάνεια των οστών που συμμετέχουν στην άρθρωση. Επιπροσθέτως, εντοπίζεται σκλήρυνση του υποχόνδριου οστού, στένωση του αρθρικού διαστήματος, σχηματισμός νέων οστικών προεξοχών στα όρια της αρθρικής επιφάνειας (οστεόφυτα), σχηματισμός κύστεων, φλεγμονή του αρθρικού υμένα, εκφυλισμός του μηνίσκου και των συνδέσμων, υπερτροφία του αρθρικού θύλακα καθώς και τροποποιήσεις στους περιαρθρικούς μυς και τα νεύρα (Loeser R. et al., 2012).



Εικόνα 1: Φυσιολογική vs Οστεοαρθριτική άρθρωση

Βλέπουμε, επομένως, πως πέραν του αρθρικού χόνδρου, προσβάλλονται και οι υπόλοιποι ιστοί της άρθρωσης, καθώς τα προαναφερθέντα ευρήματα είναι δυνατό να χαρακτηρίζουν είτε την ίδια την πάθηση είτε να αποτελούν συμπτώματα αυτής. Το γεγονός αυτό αποτελεί, πιθανότατα, τη βάση του να θεωρηθεί η ΟΑ σαν μία εκφυλιστική πάθηση ολόκληρης της άρθρωσης.

Τα άτομα που πλήττονται από την ΟΑ, υποφέρουν κυρίως από έντονους πόνους στην περιοχή της προσβεβλημένης άρθρωσης, σε συνδυασμό με δυσκαμψία κατά την κίνηση. Προοδευτικά, τα συμπτώματα γίνονται εντονότερα έως και μόνιμα, ώσπου, τελικά, χάνεται η ικανότητα της άρθρωσης για πλήρη κινητικότητα. Ως αποτέλεσμα, οι ασθενείς αδυνατούν να εκτελέσουν κινήσεις ελεύθερα, περιορίζοντας και μειώνοντας τις καθημερινές τους δραστηριότητες (π.χ. περπάτημα), οδηγούμενοι, σταδιακά, σε ραγδαία υποβάθμιση της ποιότητας ζωής τους (Goldring MB and Goldring SR, 2007).

Έχει παρατηρηθεί πως η συχνότητα εμφάνισης της ΟΑ αυξάνει αναλογικά με την ηλικία των ασθενών, γεγονός που δικαιολογεί, εν μέρει, το συνεχώς αυξανόμενο ποσοστό επιπολασμού της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, το προαναφερθέν φαίνεται πως αντικατοπτρίζει, ως ένα βαθμό, το σύγχρονο κοινωνικό φαινόμενο της αύξησης του πληθυσμού των ηλικιωμένων ατόμων, κατά κύριο λόγο, στις αναπτυγμένες χώρες (Zhang Y. et al., 2010). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι η ΟΑ τείνει να χαρακτηριστεί ως επιδημία -τουλάχιστον για τον ηλικιωμένο πληθυσμό- οι θεραπευτικές προσεγγίσεις που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα δεν φαίνεται να αντιμετωπίζουν την ασθένεια, αλλά αρκούνται στην προσπάθεια βελτίωσης της κλινικής εικόνας των ασθενών, τις περισσότερες φορές χωρίς ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα (Trzeciak T. and Czarny-Ratajczak M., 2014). Η σύγχρονη θεραπευτική στρατηγική κατά των συμπτωμάτων της ΟΑ είναι, κυρίως, φαρμακευτική και χειρουργική. Ειδικότερα, η φαρμακευτική αντιμετώπιση περιλαμβάνει την από του στόματος χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής, αναλγητικών, καθώς και την έγχυση αναλγητικών και υαλουρονικού στην περιοχή της προσβεβλημένης άρθρωσης, ενώ η χειρουργική αντιμετώπιση μπορεί είτε να περιορίζεται σε διορθωτικές μικροεπεμβάσεις στο χόνδρο και το υποχόνδριο οστό, είτε να περιλαμβάνει ολική αντικατάσταση της άρθρωσης (ολική αρθροπλαστική), πρακτική που, συν τοις άλλοις, συνεπάγεται σημαντική οικονομική επιβάρυνση για τον ασθενή και το εθνικό σύστημα υγείας (Auw Yang K.G. et al., 2004). Όλα τα παραπάνω, δικαιολογούν την αναγωγή της ΟΑ σε μέγιστο ιατρικό και κοινωνικο-οικονομικό πρόβλημα των σύγχρονων αναπτυγμένων κοινωνιών. Κρίνεται, επομένως, αναγκαία η συνεισφορά της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας, στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων, καινοτόμων θεραπευτικών πρακτικών που θα στοχεύουν στην αναστολή της εξέλιξης της ΟΑ, και κατ' επέκταση στην οριστική αντιμετώπιση της νόσου.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ταξινόμηση των διαφόρων περιστατικών ΟΑ, πραγματοποιείται με βάση διαφορετικά κριτήρια. Για παράδειγμα, η διάγνωση της παθολογικής κατάστασης της ΟΑ μπορεί να χαρακτηριστεί είτε με βάση ακτινογραφικά ευρήματα, είτε με βάση την εμφάνιση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων που έχουν συσχετιστεί με τη νόσο. Επιπλέον, η κατηγοριοποίηση της ΟΑ μπορεί να γίνει ανάλογα με το είδος και το πλήθος των προσβεβλημένων αρθρώσεων. Τέλος, η ταξινόμηση της ΟΑ, μπορεί να πραγματοποιηθεί και με βάση την αιτιολογία της, σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή (Arden N. and Nevitt M., 2006). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτοπαθής, ή ιδιοπαθής, ΟΑ εμφανίζεται, με ιδιαίτερα αυξημένη συχνότητα, σε ενήλικες προχωρημένης ηλικίας, πιθανότατα ως απόρροια της φυσιολογικής φθοράς των αρθρώσεων λόγω γήρανσης. Ωστόσο, η συσχέτιση της ηλικίας με την εκδήλωση της νόσου δεν θα πρέπει να είναι απόλυτη, καθώς έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις υπερηλίκων χωρίς κλινικά ευρήματα ΟΑ, αλλά και περιπτώσεις εμφάνισης ακτινολογικών ευρημάτων ΟΑ σε άτομα νεαρής ηλικίας. Όσον αφορά τη δευτεροπαθή ΟΑ, φαίνεται πως παρουσιάζει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε νεαρότερα άτομα, εν αντιθέσει με την ιδιοπαθή, και συνήθως έχει σαφή αιτιολογία. Ειδικότερα, καταστάσεις όπως τραυματισμοί των αρθρώσεων, ανατομικές ανωμαλίες του μυοσκελετικού συστήματος, φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως επίσης και διαταραχές στη μεταβολική δραστηριότητα, αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα αιτίων που δύνανται να οδηγήσουν στην εκδήλωση δευτεροπαθούς ΟΑ (Goldring MB and Goldring SR, 2007).

1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Όπως προαναφέρθηκε, η ΟΑ αποτελεί την πιο κοινή πάθηση τη άρθρωσης στις αναπτυγμένες χώρες, ενώ εκτιμάται πως επηρεάζει το 15% του παγκόσμιου πληθυσμού (Johnson VL. et al., 2014). Ειδικότερα, όσον αφορά τους ενήλικους άνω των 40 ετών, έχει παρατηρηθεί πως η συχνότητα εμφάνισης της ΟΑ αυξάνεται γεωμετρικά, ιδιαίτερα σε άτομα άνω των 65 ετών, με αποτέλεσμα ένα πολύ μεγάλο ποσοστό των ατόμων άνω των 75 ετών να εμφανίζουν ακτινογραφικά ευρήματα σε κάποια από τις αρθρώσεις (Dieppe P. and Lohmander LS., 2005). Επιπλέον, η ασθένεια προσβάλλει σε μεγαλύτερο ποσοστό το γυναικείο πληθυσμό, ειδικά σε ασθενείς άνω των 50 ετών (Litwic A. et al., 2013).

Τα ποσοστά επιπολασμού της ΟΑ που προκύπτουν από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες (π.χ. μελέτη Framingham) ποικίλουν και εξαρτώνται τόσο από τα κριτήρια ταξινόμησης της νόσου, όσο και από τα δημογραφικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε υπό μελέτη πληθυσμού (Zhang Y. et al., 2010). Επί παραδείγματι, το ποσοστό επιπολασμού της

ΟΑ στον πληθυσμό των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής έχει αυξηθεί ραγδαία τις 2 τελευταίες δεκαετίες (Suri P. et al., 2012), ενώ όπως έχει ανακοινωθεί, ο πληθυσμός που διαγνώστηκε με κλινικά ευρήματα ΟΑ ανήλθε σε 27.000.000 το έτος 2005, τη στιγμή που το 1995 ο αντίστοιχος πληθυσμός υπήρξε 21.000.000 (Lawrence RC et al., 1998). Όσον αφορά στους πληθυσμούς της νότιας Αμερικής, η ΟΑ εκδηλώνεται με συχνότητα 11,7% στην Κούβα (Reyes Llerena GA. et al., 2000) ενώ μόλις με 4,14% στη Βραζιλία (Senna ER et al., 2004). Σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς, όπως για παράδειγμα στη Γερμανία, εκτιμάται πως ο επιπολασμός της ΟΑ γόνατος ανέρχεται σε ~22% για τους άνδρες και σε ~36% για τις γυναίκες, μέχρι την ηλικία των 80 ετών, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά επιπολασμού της ΟΑ ισχίου εκτιμώνται σε ~14% για τους άνδρες και σε ~19% για τις γυναίκες (Litwic A. et al., 2013). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, έχει υπολογιστεί πως στο 1/3 του πληθυσμού ηλικίας άνω των 45 ετών έχει χορηγηθεί κάποιας μορφής θεραπεία έναντι της νόσου, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για άτομα άνω των 75 ετών ανέρχονται σε 49% για τις γυναίκες και σε 42% για τους άνδρες (Arthritis Research UK, Osteoarthritis in General Practice, 2013). Σε Ασιατικούς πληθυσμούς, η ΟΑ εμφανίζει ποσοστό εκδήλωσης της τάξης του 7,5-10,6% στο Μπαγκλαντές (Haq SA. et al., 2005), και 5,4-12,2% στην Ινδία (Zeng QY. et al., 2008). Σε αστικούς πληθυσμούς της ανατολικής Ασίας (Κίνα) το αντίστοιχο ποσοστό για ΟΑ γόνατος κυμαίνεται μεταξύ 4-34%, παρουσιάζοντας αύξηση ανάλογη της ηλικίας και του φύλου των συμμετεχόντων (συχνότερη σε άτομα άνω των 50 ετών, και στο γυναικείο πληθυσμό συγκριτικά με τον ανδρικό) (Fransen M. et al., 2011). Τέλος, για τον Ελληνικό πληθυσμό, όπως φαίνεται από στοιχεία που προκύπτουν από σχετική πανελλήνια επιδημιολογική μελέτη που διεξήχθη από το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Παθήσεων το έτος 2006, το συνολικό ποσοστό του επιπολασμού της ΟΑ για τον ενήλικο πληθυσμό της χώρας ανέρχεται σε ~13%. Πιο συγκεκριμένα, σε ενηλίκους άνω των 60 ετών, το ποσοστό εκτιμάται σε 14%, ενώ για άνω των 80 ετών ασθενείς, το αντίστοιχο ποσοστό αγγίζει το 30% (Andrianakos AA. et al., 2006).

1.4 ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

1.4.1 ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ

Τα χονδροκύτταρα αποτελούν το μοναδικό κυτταρικό πληθυσμό του αρθρικού χόνδρου. Προκειμένου τα χονδροκύτταρα να καταλήξουν στον σχηματισμό του αρθρικού χόνδρου, υπόκεινται σε μια διαδικασία ωρίμανσης που ονομάζεται χονδρογένεση. Η ακολουθία των γεγονότων που λαμβάνουν χώρα κατά τη χονδρογένεση, ρυθμίζεται από τη μεταγωγή σημάτων κατά την αλληλεπίδραση των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και

είναι η εξής (DeLise AM et al., 2000): Αρχικά, φαίνεται πως επιστρατεύονται μια σειρά αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων τα οποία εγκαθίστανται σε περιοχές όπου μελλοντικά θα λάβει χώρα η σκελετική ανάπτυξη. Σε επόμενο στάδιο, τα μεσεγχυματικά κύτταρα οργανώνονται σε συσσωματώματα, γεγονός που σηματοδοτεί την έναρξη της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών σε χονδροκύτταρα. Τα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα είναι, τώρα, σε θέση να παράγουν πρωτεϊνικά μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), τα οποία -μαζί με τα χονδροκύτταρα- θα αποτελέσουν τα δομικά στοιχεία του χόνδρινου ιστού.



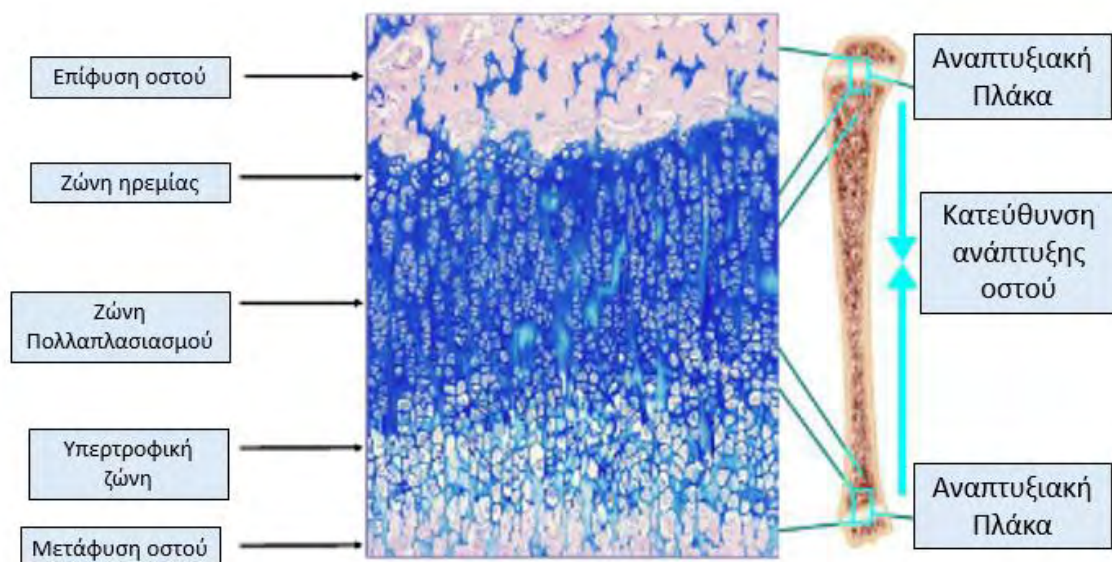
Εικόνα 2: Τα στάδια της χονδρογένεσης

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας της χονδρογένεσης, τα ώριμα χονδροκύτταρα δύνανται να ακολουθήσουν δύο οδούς: είτε να σταματήσουν τη διαφοροποίησή τους στο στάδιο αυτό και να αποτελέσουν τα ώριμα χονδροκύτταρα του μόνιμου αρθρικού χόνδρου, είτε να εξακολουθήσουν να υπόκεινται στη διαδικασία της ωρίμανσης έως ότου γίνουν υπερτροφικά, προκειμένου, τελικά, να συμμετάσχουν στην επιμήκυνση των οστών (Shum L. and Nuckolls G., 2002). Η τελευταία διεργασία ονομάζεται ενδοχόνδρια οστεοποίηση, λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και αποτελεί φυσιολογική διαδικασία του σκελετικού συστήματος μέσω της οποίας προκύπτει ο σχηματισμός των μακρών οστών του σώματος (Provot S. and Schipani E., 2005). Φαίνεται, δηλαδή, πως τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα αποτελούν, στη φάση αυτή, ενός είδους ικρίωμα για τον σχηματισμό του υποκείμενου οστού.

Αναλυτικότερα, κατά τη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, τα χονδροκύτταρα της αναπτυξιακής πλάκας που υπόκεινται σε περαιτέρω διαφοροποίηση και ωρίμανση, δίνουν τη θέση τους στους οστεοβλάστες, ώστε στην περιοχή όπου προηγουμένως

βρισκόταν ο αρθρικός χόνδρος να εδράζεται, πλέον, το αναπτυσσόμενο οστό (Kronenberg HM., 2003). Η αναπτυξιακή πλάκα παρουσιάζει χαρακτηριστική οργάνωση, αφού αποτελείται από διακριτές ζώνες, κάθε μία από τις οποίες φιλοξενεί χονδροκύτταρα διαφορετικής μορφής και μεταβολικής δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, η αναπτυξιακή πλάκα αποτελείται από τρεις βασικές ζώνες: τη ζώνη ηρεμίας, τη ζώνη πολλαπλασιασμού και την υπερτροφική ζώνη (Burdan F. et al., 2009).

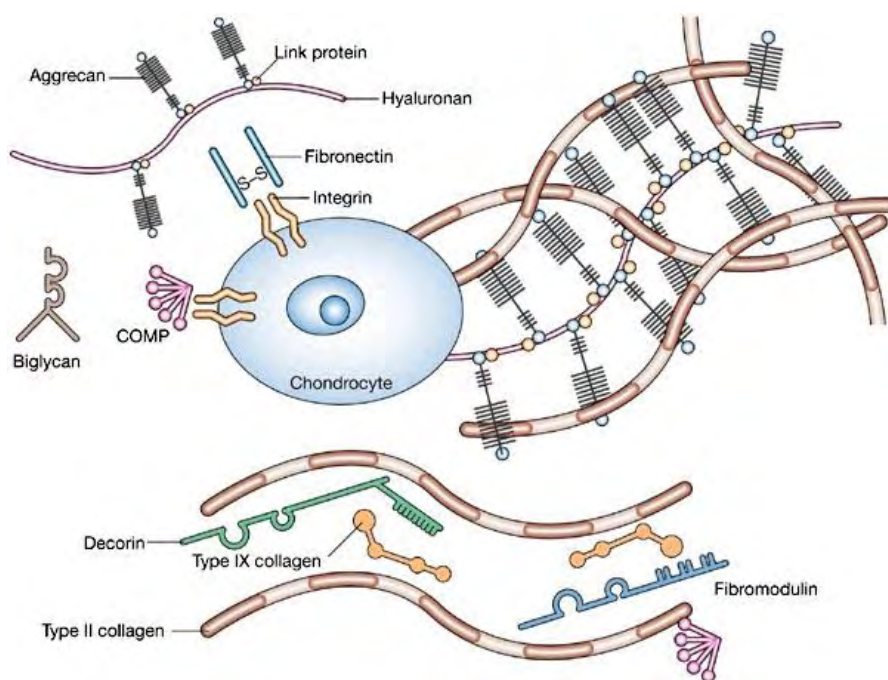
Τα χονδροκύτταρα της ζώνης ηρεμίας έχουν στρογγυλό σχήμα, δεν σχηματίζουν συσσωματώματα και χαρακτηρίζονται από χαμηλό ρυθμό πολλαπλασιασμού. Από τα συγκεκριμένα χονδροκύτταρα παράγονται δομικά μόρια της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας όπως τα μόρια κολλαγόνου τύπου II, IX, XI και αγκρεκάνες. Τα πολλαπλασιαζόμενα χονδροκύτταρα της επόμενης ζώνης, αποκτούν διαφορετικό σχήμα, γίνονται πιο πεπλατυσμένα, ενώ πέραν των προαναφερθέντων μορίων της ECM εκφράζουν και κολλαγόνο τύπου VI. Στην τρίτη ζώνη της αναπτυξιακής πλάκας, τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα παράγουν μόρια κολλαγόνου τύπου X, την καταβολική μεταλλοπρωτεΐνη MMP-13, το μεταγραφικό παράγοντα Runx2, τον VEGF κ.ά.. Παράλληλα μειώνεται η έκφραση κολλαγόνου τύπου II, IX, XI (Goldring MB et al., 2006). Την έκφραση του VEGF ακολουθεί η εισβολή αγγείων από το υποκείμενο οστό στην περιοχή του χόνδρινου ιστού και, σε επόμενη φάση, η απόπτωση μεγάλου ποσοστού των χονδροκυττάρων της υπερτροφικής ζώνης προκειμένου να αντικατασταθούν από τα κύτταρα του οστού (Mackie EJ. et al., 2008).



Εικόνα 3: Ενδοχόνδρια οστεοποίηση

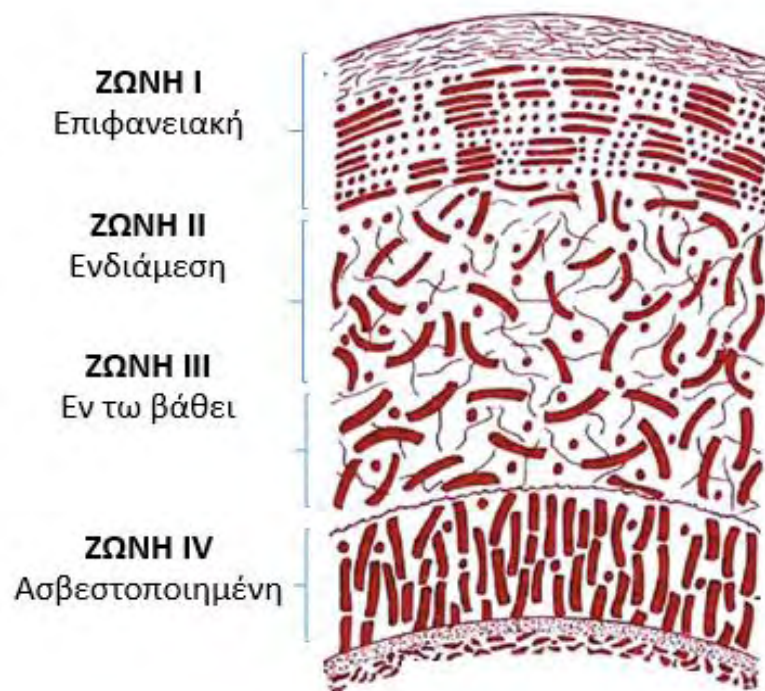
1.4.2 ΔΟΜΗ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί έναν ιστό που στερείται αγγείωσης και αποτελείται αποκλειστικά από μόρια της ECM (π.χ. πρωτεογλυκάνες, κολλαγόνο) και από χονδροκύτταρα (Peach CA. et al., 2005). Βασικό ρόλο των χονδροκυττάρων αποτελεί η μεταβολική διατήρηση ισορροπίας μεταξύ δημιουργίας και αποδόμησης των συστατικών της ECM, δεδομένου ότι η ισορροπία αυτή κινδυνεύει να διαταραχθεί από ποικίλους παράγοντες όπως τραυματισμοί, μηχανική επιβάρυνση, παράγωγα της φλεγμονής (π.χ. κυτοκίνες), αυξητικούς παράγοντες, κ.ά. (Ulrich-Vinther M. et al., 2003). Όσον αφορά στα συστατικά της ECM, όπως προαναφέρθηκε συμμετέχουν πρωτεογλυκάνες, με χαρακτηριστικότερη την οικογένεια των αγγρεκανών. Οι αγγρεκάνες τείνουν να δημιουργούν συσσωματώματα (“aggregates”) και να συνδέονται με δύο τύπους μορίων, το υαλουρονικό οξύ και μια ειδική πρωτεΐνη σύνδεσης (link protein). Άλλες πρωτεογλυκάνες που συνυπάρχουν στην ECM και συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της δομής της είναι οι ντεκορίνες, οι βεταγλυκάνες, η φιμπρονεκτίνη, η φιμπρομοντουλίνη κ.ά. (Ulrich-Vinther M. et al., 2003). Εκτός, όμως, από πρωτεογλυκάνες φαίνεται πως συμμετέχουν και πολλοί τύποι κολλαγόνου. Για παράδειγμα, το κολλαγόνο τύπου II αποτελεί το 90-95% του συνολικού κολλαγόνου του χόνδρινου ιστού και το 10% του βάρους του. Άλλοι τύποι κολλαγόνου είναι οι III, IX, XI, V, VI, XII, XIV και X, με τους τέσσερις πρώτους να απαντώνται σε γηραιότερους ιστούς και τον τελευταίο να συναπαντάται με τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα (Eyre D., 2002).



Εικόνα 4: Δομικά μόρια αρθρικού χόνδρου

Ο αρθρικός χόνδρος στο ενήλικο άτομο παρουσιάζει χαρακτηριστική δομική οργάνωση σε τέσσερις διακριτές ζώνες: την επιφανειακή ή ζώνη ολίσθησης, την ενδιάμεση ή μεταβατική, την κυκλοτερή ή εν τω βάθει και την ασβεστοποιημένη (Martel-Pelletier J. et al., 2008). Στη ζώνη ολίσθησης, τα χονδροκύτταρα εμφανίζονται αποπλατυσμένα, οι πρωτεογλυκάνες απαντώνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τα ινίδια κολλαγόνου διαρθρωμένα σε οριζόντιο προσανατολισμό, ενώ παρατηρείται, τέλος, υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Στην ενδιάμεση ζώνη, η οποία αποτελεί το 40-60% του ιστού, οι ίνες κολλαγόνου εμφανίζονται με μεγαλύτερη διάμετρο σχηματίζοντας ακτινωτές δεσμίδες, ενώ τα χονδροκύτταρα είναι υποστρογγύλα και παρουσιάζουν μεταβολική δραστηριότητα (Buckwalter JA. and Mankin HJ., 1998). Στην εν τω βάθει ζώνη, τα χονδροκύτταρα έχουν σχήμα σφαιρικό και οργανώνονται σε στήλες, ενώ τα ινίδια κολλαγόνου παρουσιάζουν κι αυτά κάθετα προσανατολισμένη διάταξη. Επίσης, το ποσοστό νερού είναι μικρότερο και η συγκέντρωση των πρωτεογλυκανών υψηλότερη σε αυτή τη στιβάδα (Onyekwelu I. et al., 2009). Τέλος, η ασβεστοποιημένη ζώνη διαχωρίζεται από τις υπερκείμενες ζώνες μέσω μιας χαρακτηριστικής ενδιάμεσης πλάκας (“tidemark”), η οποία, ουσιαστικά, διαχωρίζει το χόνδρινο ιστό από το υποχόνδριο οστό. Εδώ, συναντάμε εμφανώς λιγότερα χονδροκύτταρα μικρότερου μεγέθους και υπερτροφικού φαινοτύπου, τα οποία δεν παρουσιάζουν χαρακτηριστική δομική οργάνωση αλλά κατανέμονται τυχαία εντός της στιβάδας (Martel-Pelletier J. et al., 2008).



Εικόνα 5: Οι δομικές ζώνες του αρθρικού χόνδρου

Όπως αναφέρθηκε, ο αρθρικός χόνδρος δεν διατρέχεται από αγγεία, γεγονός που συνεπάγεται ότι τα χονδροκύτταρα δεν λαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά και το απαραίτητο οξυγόνο μέσω αυτών. Αντίθετα, προτιμάται η μέθοδος της απλής διάχυσης, μέσω του αρθρικού υγρού. Επίσης, στα πλαίσια της ρύθμισης της φυσιολογικής ομοιόστασης του αρθρικού χόνδρου, τα χονδροκύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο, καθώς φέρουν στην επιφάνειά τους μηχανικούς υποδοχείς προκειμένου να αντιστέκονται σε μηχανικές φορτίσεις, αλλά και υποδοχείς πληθώρας αυξητικών παραγόντων και κυτοκινών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταβολικής δραστηριότητας των χονδροκυττάρων (Ulrich-Vinther M. et al., 2003).

Ο μεταβολισμός των χονδροκυττάρων έγκειται στη διατήρηση ενός ισοζυγίου μεταξύ δύο αντίροπων μεταβολικών οδών: μία αναβολική (βιοσυνθετική) και μια καταβολική (εκφυλιστική). Κατά τη διαδικασία του αναβολισμού, τα χονδροκύτταρα λειτουργούν συνθέτοντας δομικά μόρια της ECM προκειμένου να διατηρήσουν τη φυσιολογική δομή του αρθρικού χόνδρου. Αντιθέτως, κατά τη διαδικασία του καταβολισμού, τα χονδροκύτταρα αλλάζουν τη μεταβολική τους δραστηριότητα και συνθέτουν, πλέον, μόρια αποδόμησης της ECM, αναστέλλοντας παράλληλα την παραγωγή δομικών μορίων (Ulrich-Vinther M. et al., 2003).



Εικόνα 6: Η διατήρηση μεταβολικής ισορροπίας από τα χονδροκύτταρα

Αξίζει να σημειωθεί, πως η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αναβολικής και καταβολικής οδού κρίνεται υψίστης σημασίας για τη διασφάλιση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του χόνδρινου ιστού. Η διαταραχή της ισορροπίας αυτής, αποτελεί, όπως θα αναλυθεί σε επόμενη παράγραφο, βασικό σημείο για την εκδήλωση της παθογένειας της ΟΑ, τόσο κατά την έναρξη, όσο και κατά την εξέλιξη της νόσου.

1.5 ΕΚΦΥΛΙΣΜΟΣ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ ΚΑΙ ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Ως ο μοναδικός κυτταρικός τύπος που απαντάται στον αρθρικό χόνδρο, τα χονδροκύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοαρθρίτιδας, κυρίως λόγω της διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού. Κατά συνέπεια, τα χονδροκύτταρα ενεργοποιούν διεργασίες αποδόμησης της ECM αναστέλλοντας, παράλληλα την παραγωγή μορίων αναδιαμόρφωσής της. Ωστόσο, η καταβολική δράση των χονδροκυττάρων δεν υιοθετείται εξ αρχής από αυτά. Φαίνεται, δηλαδή, πως σε αρχικά στάδια της ασθένειας, τα χονδροκύτταρα αναλαμβάνουν να ανακατασκευάσουν τον εκφυλισμένο ιστό, συνθέτοντας δομικά μόρια της ECM (π.χ. αγγρεκάνες, κολλαγόνο τύπου II, IX, X), εν αντιθέσει με τη δραστηριότητα που αναλαμβάνουν σε προχωρημένα στάδια, όπου μέσω καταβολικών διεργασιών ενισχύουν την αποδόμηση της ECM άρα και τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου (Loeser R. et al., 2012). Επιπλέον, καθώς φαίνεται από την παρουσία τύπων κολλαγόνου X τα οποία αποτελούν χαρακτηριστικό δομικό μόριο σε περίπτωση παρουσίας υπερτροφικών χονδροκυττάρων στον ενήλικο αρθρικό χόνδρο, υποδηλώνει πως στην περίπτωση της ΟΑ, τα χονδροκύτταρα υπόκεινται σε φαινοτυπική τροποποίηση (Sun MM. and Beier F., 2014).

Χαρακτηριστικό στοιχείο κατά τον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου στην ΟΑ αποτελεί η παρουσία και η δράση καταβολικών ενζύμων. Τα βασικότερα καταλυτικά ένζυμα που απαντώνται σε προσβεβλημένο χόνδρινο ιστό αποτελούν οι αγγρεκανάσες και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της ECM. Όσον αφορά τις αγγρεκανάσες (ADAMTSs), φαίνεται πως διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο κατά την αποδόμηση της ECM, στοχεύοντας, πιο συγκεκριμένα, τα μόρια της αγγρεκάνης. Οι δύο αγγρεκανάσες που έχουν απομονωθεί, μέχρι σήμερα, στον αρθρικό χόνδρο είναι οι ADAMTS-4 και ADAMTS-5, οι οποίες δραστηριοποιούνται κατά κύριο λόγο στα αρχικά στάδια της ΟΑ (Nagase H. and Kashiwagi M., 2003), αν και σύγχρονες μελέτες αναφέρουν την έκφραση (Flannery CR. et al., 1999) και την καταβολική δραστηριότητα της ADAMTS-1 στον αρθρικό χόνδρο (Rodríguez-Manzaneque JC. et al., 2002), (Kuno K. et al., 2000). Τέλος, η δράση τους είναι πιθανό να επάγεται και από την παρουσία προϊόντων της φλεγμονής στο μικροπεριβάλλον της άρθρωσης, όπως IL-1α, IL-1β, TNF-α (Fernandes JC. et al., 2002), αλλά και αυξητικών παραγόντων όπως ο TGF-β (Blaney Davidson EN. et al., 2007).

Όπως προαναφέρθηκε, εκτός των αγγρεκανασών, από τα χονδροκύτταρα κατά την ΟΑ παράγονται και μεταλλοπρωτεϊνάσες της ECM (MMPs) καθώς και πρωτεΐνες αναστολές αυτών (TIMPs), τα οποία μόρια ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό την καταβολική δραστηριότητα στην περιοχή του προσβεβλημένου χόνδρου. Για την ακρίβεια, οι MMPs ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των ενδοπεπτιδασών, ενώ ο ρόλος τους έγκειται στην αποδόμηση πρωτεϊνικών

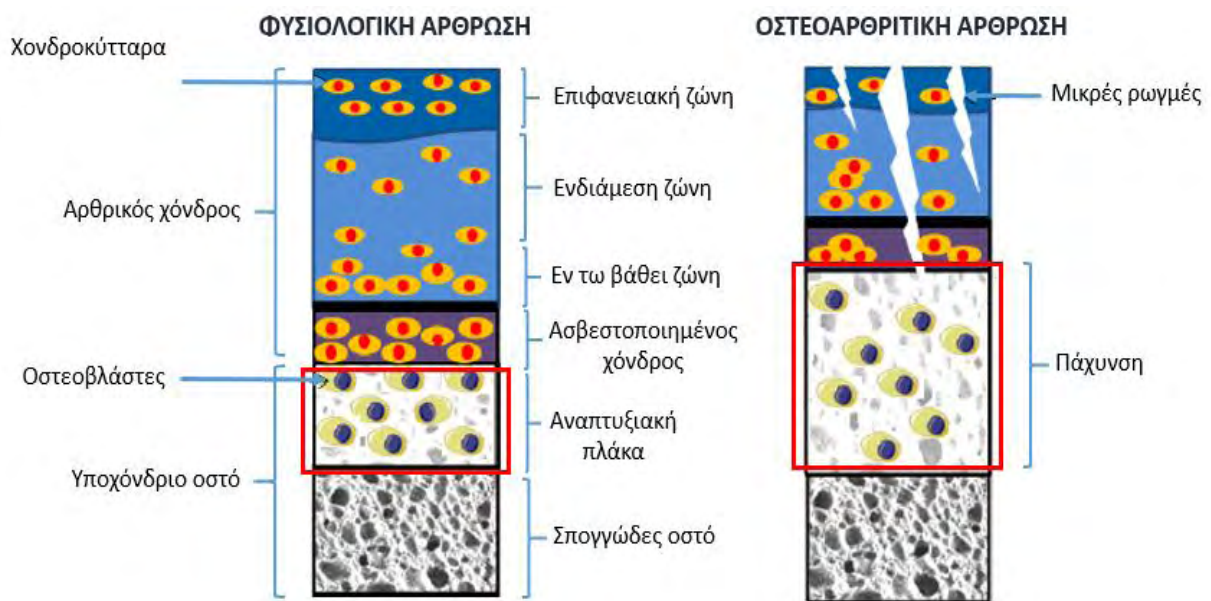
μορίων της ECM (π.χ. κολλαγόνο, πρωτεογλυκάνες), αλλά και στην ενεργοποίηση αδρανών μορφών MMPs. Στο φυσιολογικό αρθρικό χόνδρο, η δράση των αναστολέων TIMPs παρατηρείται ενισχυμένη σε σχέση με εκείνη των MMPs, συμβάλλοντας, έτσι, στη διατήρηση της ομοιόστασης του ιστού. Στην ΟΑ, όμως, φαίνεται πως η κατάσταση αντιστρέφεται, καθώς παρατηρείται ενίσχυση της καταβολικής δράσης των MMPs. Στα πλαίσια αυτής της μεταβολικής διαταραχής, τα χονδροκύτταρα εκφράζουν πληθώρα μορίων MMPs (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-2, MMP-9) καθεμία από τις οποίες είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση συγκεκριμένων δομικών συστατικών της ECM σε διαφορετικά στάδια εξέλιξης της νόσου (Troeberg L. and Nagase H., 2012), (Cawston TE. and Young DA., 2010). Από όλες τις προαναφερθείσες MMPs, σημαντικότερος φαίνεται να είναι ο ρόλος της MMP-13, καθώς έχει βρεθεί πως είναι ικανή να αποδομήσει το κολλαγόνο τύπου II (90-95% αρθρικού χόνδρου) έως και δέκα φορές περισσότερο, συγκριτικά με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των MMPs (Kevorkian L. et al., 2004).

Πέραν της διαταραχής στην ισορροπία της μεταβολικής λειτουργίας των χονδροκυττάρων, καθοριστικό ρόλο στην παθογένεση της ΟΑ διαδραματίζει και η φλεγμονή. Αποτελεί, μάλιστα, μία από τις πιθανές αιτίες που προκαλούν την προαναφερθείσα διαταραχή στην ισορροπία αναβολισμού και καταβολισμού από τα χονδροκύτταρα. Κι αυτό, καθώς τα χονδροκύτταρα είναι σε θέση να εκκρίνουν ή να αντιδρούν σε παράγωγα της φλεγμονής, όπως οι χημοκίνες και οι κυτοκίνες, μόρια τα οποία ανιχνεύονται στο μικροπεριβάλλον ΟΑ αρθρώσεων. Πέραν των χημοκινών και κυτοκινών, στην περιοχή της προσβεβλημένης άρθρωσης συνεντοπίζονται και ένα σύνολο επιπλέον διαμεσολαβητών της φλεγμονώδους αντίδρασης, όπως οι προσταγλαδίνες, οι ιντερλευκίνη IL-1 β και ο TNF- α (Pelletier JP. et al., 2001).

Ακόμα, η εκδήλωση της ΟΑ έχει συσχετιστεί με διεργασίες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, όπως η κυτταρική γήρανση και η απόπτωση των χονδροκυττάρων. Όπως έχει προκύψει από σχετικές μελέτες, το οξειδωτικό στρες αποτελεί παράγοντα «κλειδί» για τη δυσλειτουργία των χονδροκυττάρων στην ΟΑ, λόγω του ότι προκαλεί τη μείωση των τελομερών και του αριθμού των μιτοχονδρίων τους, οδηγώντας τα σε πρόωρη κυτταρική γήρανση (Yudoh K. et al., 2005), (Brandl A. et al., 2011).

Τέλος, άλλη μια διαδικασία που εμπλέκεται στην παθογένεια της ΟΑ αποτελεί η ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, τα χονδροκύτταρα του μόνιμου αρθρικού χόνδρου διατηρούν χαμηλούς μεταβολικούς ρυθμούς, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ενώ δεν υφίστανται περαιτέρω ωρίμανση, ούτε αποπίπτουν. Η εκδήλωση υπερτροφικού φαινοτύπου από τα χονδροκύτταρα, και η απόπτωση αυτών προκειμένου να αντικατασταθούν από κύτταρα οστεοβλαστών, λαμβάνουν χώρα φυσιολογικά στην περιοχή της αυξητικής πλάκας κατά το σχηματισμό του οστού. Στην

περίπτωση, όμως, της ΟΑ, φαίνεται πως κάτι τέτοιο δεν ισχύει, αφού, όπως έχει παρατηρηθεί, ο μόνιμος αρθρικός χόνδρος παρουσιάζει αδυναμία διατήρησης των χαρακτηριστικών του λόγω της εισόδου των πολλαπλασιαζόμενων χονδροκυττάρων στο τελικό στάδιο της διαφοροποίησης τους, στη φάση, δηλαδή, της υπερτροφίας (Dreier R., 2010). Παράλληλα, παρατηρείται και η έκφραση μορίων αυστηρά σχετιζόμενων με τον υπερτροφικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων, όπως το κολλαγόνο τύπου X (Gouttenoire J. et al., 2004), η αλκαλική φωσφατάση (Pfander D. et al., 2003), η αννεξίνη (Kirsch T. et al., 2000), και η οστεοκαλσίνη (Pullig O. et al., 2000). Επιπροσθέτως, παρατηρείται και έκφραση του VEGF συνοδευόμενη από την εισβολή αγγείων στην περιοχή του προσβεβλημένου χόνδρου, γεγονός που οδηγεί σε απόπτωση τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα, και στο σχηματισμό νέων οστικών δομών στη συγκεκριμένη περιοχή, των οστεόφυτων (Murata M. et al., 2008). Συνεπώς, όπως φαίνεται από τα παραπάνω, οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την εξέλιξη της ΟΑ και που σχετίζονται με την υπερτροφία των χονδροκυττάρων, ομοιάζουν σε μεγάλο βαθμό με την αντίστοιχη συμπεριφορά των χονδροκυττάρων κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση.



Εικόνα 7: Η παραμόρφωση της δομής του αρθρικού χόνδρου κατά την ΟΑ

1.6 ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ: ΕΝΑ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΟ ΝΟΣΗΜΑ

1.6.1 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η εκδήλωση της ΟΑ προκύπτει από τη δράση προδιαθεσικών παραγόντων κινδύνου, οι οποίοι κατηγοριοποιούνται σε συστημικούς και εμβιομηχανικούς (Felson DT. et al., 2000). Ως συστημικοί, χαρακτηρίζονται οι προδιαθεσικοί παράγοντες οι οποίοι δύνανται, άμεσα είτε έμμεσα, να οξύνουν την επιδεκτικότητα της άρθρωσης στη φθορά, αλλά και να εμποδίσουν τις διεργασίες επιδιόρθωσης που λαμβάνουν χώρα εντός της άρθρωσης (π.χ. ηλικία, φύλο, παχυσαρκία, εθνικότητα, οστική πυκνότητα, ορμονικοί παράγοντες, γενετικοί παράγοντες) ενώ ως εμβιομηχανικοί, χαρακτηρίζονται οι παράγοντες κινδύνου οι οποίοι συχνά αποτελούν πιθανά αίτια τραυματισμού ή μηχανικής επιβάρυνσης των αρθρώσεων (π.χ. φυσική δραστηριότητα, τραυματισμός άρθρωσης, ατροφία περιαρθρικού μυός κ.ά.) (Arden N. and Nevitt M., 2006). Οι συστημικοί και οι εμβιομηχανικοί παράγοντες δεν δρουν ανεξάρτητα προκειμένου να καθορίσουν την εξέλιξη της νόσου. Αντιθέτως, φαίνεται πως εντός της άρθρωσης λαμβάνει χώρα μιας μορφής αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών, η οποία εξηγεί, εν μέρει, την ετερογένεια της ΟΑ και καθορίζει, σε μεγάλο βαθμό, την εξέλιξη αυτής (Suri P. et al., 2012). Επιπροσθέτως, ιδιαίτερη πολυπλοκότητα παρουσιάζουν και οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση της ασθένειας, καθώς σύμφωνα με σχετικές μελέτες, φαίνεται πως τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά την εξέλιξη της ΟΑ κάθε είδους (πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς, οποιασδήποτε άρθρωσης) επιστρατεύονται πλήθος μοριακών σηματοδοτικών μονοπατιών, σε πληθώρα κυτταρικών τύπων, επιφέροντας τις ανάλογες επιπτώσεις στην περιοχή των αρθρώσεων. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες *ex vivo* σε ιστούς που προήλθαν από ασθενείς με ΟΑ, καθώς και μελέτες *in vivo* σε ποντίκια που έφεραν αντίστοιχες μεταλλάξεις, έχουν καταδείξει τη συμμετοχή σηματοδοτικών μορίων [π.χ. μόρια Smad, β-catenin, και ο παράγοντας υποξίας 2a (HIF-2a)], μορίων-προσδετών σε κατάλληλους υποδοχείς [π.χ. TGF-β1, WNT3a και IHH (Indian Hedgehog)] αλλά και ενδοπεπτιδασών [όπως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες της ECM (MMPs) και οι αγγρεκανάσες (ADAMTSs)], στην παθογένεση της ΟΑ (Wang M. et al., 2011). Γίνεται, επομένως, αντιληπτό το γεγονός ότι η δράση των προαναφερθέντων προδιαθεσικών παραγόντων, σε συνδυασμό με πολύπλοκους βιοχημικούς μηχανισμούς και σηματοδοτικά μονοπάτια που επιστρατεύονται στην περιοχή των αρθρώσεων -μέσω πολυσύνθετων αλληλεπιδράσεων- οδηγούν στην εκδήλωση ΟΑ. Στην Εικόνα 8 συνοψίζονται όλα όσα προαναφέρθηκαν σχετικά με την αλληλεπίδραση προδιαθεσικών παραγόντων και μοριακών μηχανισμών στην παθογένεση της ΟΑ.



Εικόνα 8: Η αλληλεπίδραση παραγόντων κινδύνου και μοριακών μηχανισμών στην παθογένεση της ΟΑ

1.6.2 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑΣ

Η παθογένεια της ΟΑ σε οποιασδήποτε μορφή εκδήλωσης της (στις διάφορες αρθρώσεις, ιδιοπαθής και μη), όπως προκύπτει από πληθώρα επιδημιολογικών ερευνών και γενετικών αναλύσεων, έγκειται στην αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών και γενετικών παραμέτρων (Panoutsopoulou K. and Zeggini E., 2013). Ειδικότερα, φαίνεται πως η ΟΑ αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό νόσημα με ισχυρή γενετική συνιστώσα, καθώς, έχει βρεθεί πως κατά ένα μεγάλο ποσοστό (~50%) έγκειται στον παράγοντα κληρονομικότητα, εξαρτάται, δηλαδή, από την ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης για τον ασθενή (Zengini E. et al, 2016). Κατ' αναλογία με άλλα πολυπαραγοντικά νοσήματα πολύπλοκης αιτο-παθογένειας, η «γενετική αρχιτεκτονική» (genetic architecture) της ΟΑ χαρακτηρίζεται ως πολυγονιδιακή, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή μεγάλου αριθμού γονιδίων τα οποία είτε σχετίζονται άμεσα με την ΟΑ, είτε εμπλέκονται έμμεσα στην παθογένεση της νόσου μέσω συμμετοχής τους σε λιγότερο καλά συσχετισμένα με την ΟΑ μοριακά μονοπάτια. Επιπλέον, ιδιαίτερο ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζει το μεγάλο πλήθος πολυμορφικών θέσεων που εδράζονται εντός ή παρακείμενα των αλληλουχιών των προαναφερθέντων γονιδίων και που επιφέρουν άλλοτε σοβαρές και άλλοτε ηπιότερες φαινοτυπικές αλλοιώσεις (Panoutsopoulou K. and Zeggini E., 2013). Η σύγχρονη επιστημονική έρευνα γύρω από τη γενετική βάση της ΟΑ, ακολουθεί τις εξής πειραματικές προσεγγίσεις: μελέτες ανάλυσης σύνδεσης και μελέτης συσχέτισης.

1.6.2.1 ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ

Οι μελέτες ανάλυσης σύνδεσης βασίζονται στη μελέτη οικογενειών με περισσότερα από ένα προσβεβλημένα άτομα, ενώ χρησιμοποιούνται συχνά για τη γενετική ανάλυση νοσημάτων με υψηλά ποσοστά εμφάνισης στον πληθυσμό, όπως η ΟΑ. Μέχρι σήμερα, έχουν διεξαχθεί δημοσιευμένες μελέτες ανάλυσης σύνδεσης σε Η.Π.Α (USA study) (Demissie S. et al., 2002), (Hunter DJ. et al., 2004), Φινλανδία (Finnish study) (Leppävuori J et al., 1999) και Ισλανδία (Iceland study) (Stefánsson SE. et al., 2003). Οι προαναφερθείσες μελέτες παρουσιάζουν ένα σύνολο χρωμοσωμικών περιοχών που πιθανότατα σχετίζονται με τον ΟΑ φαινότυπο. Ένα μεγάλο ποσοστό των περιοχών αυτών, έχουν τεθεί υπό διερεύνηση σε μελέτες συσχέτισης και έχει βρεθεί πως περιέχουν γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου.

1.6.2.2 ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ

Η σύγχρονη προσέγγιση στη διεξαγωγή μελετών συσχέτισης συγκεκριμένων υποψηφίων γονιδίων ή/και πολυμορφισμών με την εκάστοτε υπό μελέτη ασθένεια στρέφεται, πλέον, στην αντικατάσταση αυτών από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Genome-wide association scan, GWAS). Οι μελέτες GWAS χρησιμοποιούν απαραίτητως μεγάλο αριθμό ατόμων, προκειμένου να είναι εφικτή τόσο η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων, όσο και η επαναληψιμότητα της έρευνας, εάν αυτό κριθεί αναγκαίο (Reynard LN. and Loughlin J., 2013). Μέχρι σήμερα έχουν διεξαχθεί και δημοσιευθεί τρεις μεγάλες μελέτες GWAS: η μελέτη του Tokyo, η μελέτη του Rotterdam και η μελέτη arcOGEN.

Από τις μελέτες GWAS κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση 18 γενετικών τόπων που σχετίζονται με την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου, σε Ευρωπαϊκούς και Ασιατικούς πληθυσμούς, οι οποίοι, ωστόσο, αποτελούν μονάχα το ~10% της γενετικής συνιστώσας για την παθογένεια της νόσου (Panoutsopoulou K. and Zeggini E., 2013). Οι γενετικοί τόποι αυτοί, καθώς και η λειτουργία των γονιδίων που έχουν αποκαλύψει, συνοψίζονται στον *Πίνακα 1*.

Ωστόσο, μόνο ένας από τους παραπάνω γενετικούς τόπους (GDF5) φαίνεται να παρουσιάζει εξαιρετικά ισχυρή και κατ' επανάληψη συσχέτιση με την παθογένεια της ΟΑ, σε μελέτες GWAS (Zengini E. et al., 2016).

Πίνακας 1: 18 γενετικοί τόποι που έχουν συσχετιστεί με την ΟΑ

SNP	Genes	Function	EA	p-value	Site	Sex	Ethnicity
rs143383	GDF5	bone morphogenetic protein 14 - TGF-β superfamily	T	2×10^{-11} 8.3×10^{-9}	Hip Knee	Both	Asian European
rs7639618	DVWA	VWA domain - in cartilage tissues	G	7.3×10^{-11}	Knee	Both	Asian
rs7775228	HLA-DQB1	human leucocyte antigen	T	2.4×10^{-8}	Knee	Both	Asian
rs10947262	BTNL2		C	5.1×10^{-9}	Knee	Both	Asian/ European
rs3815148	COG5		C	8×10^{-8}	Knee/ hand	Both	European
rs4730250	DUS4L		G	9.2×10^{-9}	Knee	Both	European
rs11842874	MCF2L	regulates neurotrophin-3-induced cell migration in Schwann cells	A	2.1×10^{-8}	Knee/ hip	Both	European
rs6976	GLT8D1		T	7.2×10^{-11}	Hip/ knee	Both	European
rs11177	GNL3		A	1.3×10^{-10}	Hip/ knee	Both	European
rs4836732	ASTN2	astrotactin 2 - membrane protein - regulates surface levels of ASTN1 during neuronal migration	C	6.1×10^{-10}	Hip	Females	European
Rs9350591	FILIP1; SENP6	filamin A interacting protein 1 - sentrin specific peptidase 6	T	2.4×10^{-9}	Hip	Both	European
rs10492367	KLHDC5; PTHLH	kelch domain containing 5 - parathyroid hormone-like hormone (regulates endochondral ossification)	T	1.5×10^{-8}	Hip	Both	European
rs835487	CHST11	encodes an enzyme specific for the transfer of sulfate groups to the 4-O position in chondroitin	G	1.6×10^{-8}	Hip	Both	European
rs12107036	TP63	tumor protein p63	G	6.7×10^{-8}	Knee	Females	European
rs8044769	FTO	fat mass and obesity associated gene	C	6.9×10^{-8}	Hip/ knee	Females	European
rs10948172	SUPT3H; CDC5L	in the same LD block is the RUNX2 essential for osteoblast development	G	7.9×10^{-8}	Hip/ knee	Males	European
rs6094710	NCOA3	involved in the co-activation of nuclear receptors of steroids (skeletal metabolism)	A	7.9×10^{-9}	Hip	Both	European
rs12982744	DOT1L	encodes an enzyme for Wnt activation	C	7.8×10^{-9}	Hip	Males	European

1.6.3 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η πολυπαραγοντική αιτιολογία της παθογένειας της ΟΑ εξηγείται, όπως προαναφέρθηκε, κατά 50% από τη γενετική βάση της νόσου, ενώ μελέτες GWAS έχουν αποκαλύψει ένα σύνολο γενετικών τόπων που σχετίζονται με το νόσημα. Απομένει, ωστόσο, ένα εξίσου μεγάλο ποσοστό (“missing heritability”) για το οποίο δεν έχουμε ακόμα σαφή εικόνα (Roberts SB. et al., 2015). Ενδεχομένως, λοιπόν, η διερεύνηση του ρόλου της επιγενετικής ρύθμισης -πέραν της γενετικής συνιστώσας- θα μπορούσε να συμβάλλει στην κατανόηση της ετερογενούς και πολύπλοκης αιτιο-παθογένειας της ΟΑ.

Στην επιγενετική ρύθμιση της ΟΑ συμμετέχουν διεργασίες που δημιουργούν τροποποιήσεις στη γονιδιακή έκφραση, οι οποίες είναι κληρονομήσιμες χωρίς, ωστόσο, να προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA. Οι σημαντικότερες από αυτές, οι οποίες αναλύονται παρακάτω, είναι: η μεθυλίωση του DNA, η ακετυλίωση των ιστονών και η ρυθμιστική δράση των micro-RNAs.

1.6.3.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο επιγενετικό μηχανισμό ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Μέσω της μεθυλίωσης, επιτυγχάνεται αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, με σκοπό να εμποδίζεται η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στο DNA αναστέλλοντας, έτσι, τη γονιδιακή έκφραση (Hyeonkyeong K. et al., 2015). Η διεργασία της μεθυλίωσης συνίσταται στην προσθήκη μεθυλομάδων (-CH₃) στον 5' άνθρακα νουκλεοτιδίων κυτοσίνης (5-mC). Η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα σχεδόν ολοκληρωτικά σε περιοχές πλούσιες σε δινουκλεοτιδικές επαναλήψεις της μορφής CpG, τις λεγόμενες CpG νησίδες, οι οποίες -στη μεγάλη τους πλειοψηφία- εδράζονται εντός αλληλουχιών των υποκινητών των γονιδίων. Τέλος, η διαδικασία καταλύεται από ειδικά ένζυμα, που ονομάζονται μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) (Roberts SB. et al., 2015).

Μέχρι σήμερα, έχουν διεξαχθεί και δημοσιευθεί 5 μεγάλες μελέτες GWAS του μεθυλιώματος για την ΟΑ (Fernandez-Tajés J et al., 2014) η οποία ήταν η πρώτη που διεξήχθη, (Rushton MD et al., 2014), (Jeffries MA et al., 2014), (Moazedi-Fuerst FC et al., 2014) και (den Hollander W et al., 2014).

Από τις παραπάνω μελέτες συνάγονται τα εξής συμπεράσματα αναφορικά με το ρόλο της τροποποιητικής δράσης της μεθυλίωσης στην εξέλιξη της ΟΑ: Αρχικά, τα γονίδια σχετιζόμενα με την ΟΑ υποκρύπτουν περιοχές CpG, οι οποίες αποτελούν στόχους των DNMTs για μεθυλίωση. Κατά συνέπεια, η αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης στα γονίδια αυτά πιθανότατα σχετίζεται με την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου. Αξίζει, δε, να σημειωθεί πως το πρότυπο μεθυλίωσης γονιδίων σχετιζόμενων με ΟΑ εμφανίζει σημαντικές αλλαγές οι οποίες ακολουθούν την πορεία της εξέλιξης της νόσου. Επιπλέον, τα ΟΑ δείγματα προερχόμενα από διαφορετικές αρθρώσεις (π.χ. γόνατος, ισχίου) παρουσιάζουν -εκτός από διαφορετική γονιδιακή έκφραση- διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης. Τέλος, πιθανές αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης γενετικών τόπων σχετιζόμενων με την ΟΑ πιθανότατα συμβαίνουν σε συνδυασμό με την ύπαρξη πολυμορφισμών (SNPs) εντός των συγκεκριμένων περιοχών (Loughlin J., 2015).

1.6.3.2 ΑΚΕΤΥΛΙΩΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Τις επιγενετικές τροποποιητικές διεργασίες που αφορούν τις ιστόνες αποτελούν η ακετυλίωση, η μεθυλίωση, η φωσφορυλίωση, η σουμοϋλίωση, η ουβικουϊτινίλωση ή και ο συνδυασμός αυτών. Ο τρόπος με τον οποίο δρουν ρυθμίζοντας τη διαδικασία της μεταγραφής συνίσταται τόσο στην αναδιαμόρφωση της δομής της χρωματίνης, όσο και στη ρύθμιση της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων (Kouzarides T., 2007).

Η ακετυλίωση αποτελεί την καλύτερα μελετημένη τροποποιητική διαδικασία των ιστονών και κρίνεται απολύτως απαραίτητη για την σωστή πρόσδεση των κατάλληλων μεταγραφικών παραγόντων, επομένως, και για την έναρξη της γονιδιακής έκφρασης. Η ακετυλίωση των ιστονών καταλύεται από ειδικά ένζυμα που ονομάζονται ακετυλοτρανσφεράσες (HATS). Τη δράση της ακετυλίωσης ακολουθεί εκείνη της από-ακετυλίωσης η οποία επιφέρει αποτελέσματα αντίθετα της ακετυλίωσης, αναστέλλει, δηλαδή, την έκφραση των γονιδίων (Roberts SB. et al., 2015).

Όσον αφορά το ρόλο της ακετυλίωσης και από-ακετυλίωσης των ιστονών στην εξέλιξη της OA, σύγχρονες μελέτες έχουν δείξει πως οι προαναφερθείσες διεργασίες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το φαινότυπο των χονδροκυττάρων και την ισορροπία της μεταβολικής τους δραστηριότητας μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού (Hyeonkyeong K et al., 2015). Παραδείγματος χάριν, ορισμένες HDACs έχει βρεθεί πως υπερεκφράζονται στα OA χονδροκύτταρα επάγοντας καταβολικές διεργασίες, πιθανότατα μέσω της θετικής ρύθμισης της έκφρασης μορίων αποδόμησης της ECM (Higashiyama R et al., 2010).

Οι σιρτουΐνες (SIRT1s), αποτελούν μία υποοικογένεια των HDACs, για τις οποίες σχετικές μελέτες δείχνουν πως, πιθανότατα, εμπλέκονται στην παθογένεια τη OA. Η καλύτερα μελετημένη σιρτουΐνη είναι η SIRT1, ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας έγκειται στις εξής δράσεις (Hyeonkyeong K et al., 2015): i) Αναστέλλει τη διαδικασία της απόπτωσης στα χονδροκύτταρα, αποτρέποντας με τον τρόπο αυτό τη διαφοροποίησή τους μέσω της διαδικασίας της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, ii) σχηματίζει σύμπλοκο με τη SET7/9 ή το SOX9 κι επάγει την έκφραση δομικών μορίων της ECM (π.χ. μορίων COL2A1) ενώ παράλληλα iii) αναστέλλει τη δράση των μορίων αποδόμησης της ECM (π.χ. MMPs, ADAMPTs). Τέλος, iv) δρα ως διαμεσολαβητής της φλεγμονώδους αντίδρασης, στοχεύοντας μόρια όπως ο TNFα και η IL-1β, αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό τη διαδικασία της επαγόμενης από τη φλεγμονή απόπτωσης. Στην περίπτωση, ωστόσο, της OA, η SIRT1 έχει βρεθεί πως υποεκφράζεται.

1.7 TA Micro-RNAs

Τα micro-RNAs ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά από τον Lee και τους συνεργάτες του, νωρίς κατά τη δεκαετία του 90, στον οργανισμό-μοντέλο *Caenorhabditis elegans* (Lee RC. et al., 1993). Έκτοτε, ολοένα και περισσότερες μελέτες διεξάγονται με αντικείμενο το ρόλο των micro-RNAs, αφού, μέχρι σήμερα, φαίνεται να έχουν ταυτοποιηθεί 28,000 miRNAs, κατά προσέγγιση (Nugent M., 2016). Τα miRNAs, έχει επικρατήσει να συγκαταλέγονται στους μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Roberts SB. et al., 2015), αφού -όπως θα αναλυθεί και παρακάτω-: πρώτον, η αλληλουχία

από την οποία προκύπτουν ανήκει στην αλληλουχία του DNA του εκάστοτε οργανισμού, άρα κληρονομείται κατ' αναλογία με οποιοδήποτε γονίδιο και δεύτερον, ο τρόπος με τον οποίο τροποποιούν τη γονιδιακή έκφραση δεν αλλάζει την αλληλουχία των βάσεων της γονιδιακής περιοχής που υπόκειται σε ρύθμιση.

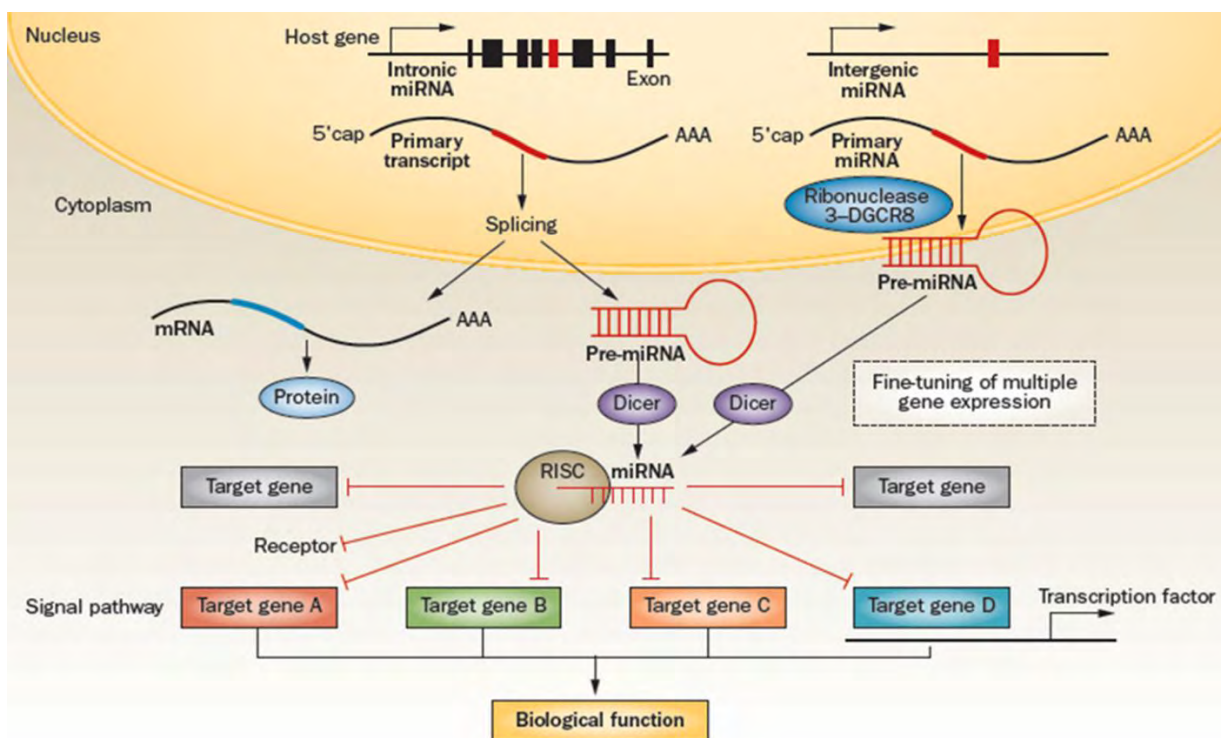
Η ανακάλυψη των miRNAs, στηρίχθηκε στην ανίχνευση γονιδίων που δεν κωδικοποιούν mRNAs για την παραγωγή κάποιου πρωτεϊνικού μορίου, αλλά μικρών, μονόκλωνων RNAs (Micro ribonucleic acids - MiRNAs), τα οποία αποτελούν ισχυρούς ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης (Roberts SB. et al., 2015). Πρόκειται για μη-κωδικά μόρια RNA, μήκους ~22 νουκλεοτιδίων, τα οποία είτε προάγουν τον κατακερματισμό είτε αναστέλλουν την έκφραση του αγγελιαφόρου RNA (mRNA). Ειδικότερα, τα mi-RNAs αλληλεπιδρούν με το mRNA του εκάστοτε γονιδίου-στόχου, μέσω της πρόσδεσης τους στην 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) αυτού. Έχει, ωστόσο, σημειωθεί πως τα mi-RNAs είναι δυνατό να προσδένονται και στην 5'-αμετάφραστη περιοχή του mRNA (5'-UTR) (Miyaki S. and Asahara H., 2012).

Στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι στιγμής περί τα 2.042 miRNAs (Kozomara A. and Griffiths-Jones S., 2011), τα οποία αντιπροσωπεύουν το 3% του συνόλου των ανθρώπινων γονιδίων, και είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της έκφρασης >50% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Li C. et al., 2009). Τα γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση των miRNAs, εντοπίζονται -στη μεγάλη τους πλειοψηφία- σε εσώνια γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή σε μη κωδικοποιούσες περιοχές που παρεμβάλλονται μεταξύ αλληλουχιών μεταγραφόμενων περιοχών. Σε πιο σπάνιες περιπτώσεις, τα γονίδια των miRNAs εδράζονται εντός αλληλουχιών εξωνίων σε προσανατολισμό αντινοηματικό (antisense) σε σχέση με την γονιδιακή αλληλουχία που κωδικοποιεί την αντίστοιχη πρωτεΐνη (Lee Y. et al, 2002).

1.7.1 ΒΙΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ Micro-RNAs

Η διαδικασία της βιογένεσης των miRNAs αποτελεί μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, και παρουσιάζει διαφοροποιήσεις ανάλογα με το είδος του ευκαρυωτικού οργανισμού (π.χ. φυτά, παράσιτα, θηλαστικά κ.λ.π) (Bartel DP., 2004). Η ακολουθία των γεγονότων κατά τη βιογένεση των miRNAs στα ανθρώπινα κύτταρα περιγράφεται παρακάτω: αρχικά, πραγματοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου του εκάστοτε miRNA, διαδικασία που καταλύεται από το ένζυμο RNA πολυμεράση II (RNAPol-II), από την οποία θα προκύψει το πρόωμο miRNA (pri-miRNA) (Lee Y. et al., 2004). Το συγκεκριμένο μετάγραφο μήκους ~100 νουκλεοτιδίων, αφότου δεχθεί την προσθήκη καλύπτρας μεθυλιωμένης γουανίνης στο 5' άκρο (5'cap) υπόκειται σε διεργασία πολυαδενυλίωσης (Cai X. et al., 2004). Είναι, επίσης,

πιθανό το αρχικό μετάγραφο του miRNA να περιέχει παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες εσωνίων, κατ'αναλογία, δηλαδή, με τα αντίστοιχα mRNA μετάγραφα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, οπότε υπόκεινται σε μια επεξεργασία ωρίμανσης. Στο σημείο αυτό, το pri-miRNA πέπτεται από ένα ειδικό ένζυμο, την RNAάση Dorsha, η οποία -παρουσία του μορίου DGCR8- παράγει το πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) (Han J. et al., 2004). Το pre-miRNA, μήκους ~70 νουκλεοτιδίων υπό τη μορφή φουρκέτας και συνοδευόμενο από την πρωτεΐνη μεταφοράς Exportin 5, εξάγεται από τον πυρήνα του κυττάρου στο κυτταρόπλασμα, διαδικασία που μεσολαβείται από την υδρόλυση GTP (Lund E. et al., 2004). Στο σημείο αυτό, προκειμένου το pre-miRNA να καταστεί ενεργό, θα πρέπει να ολοκληρωθεί η διαδικασία της ωρίμανσής του και να παραχθεί το τελικό ώριμο miRNA. Για το σκοπό αυτό, επιστρατεύεται το ένζυμο Dicer. Η συγκεκριμένη ενδοριβονουκλεάση αποτελεί μια εξαιρετικά συντηρημένη RNAase-III, με τη ιδιότητα της ελικάσης. Από την επεξεργασία του pre-miRNA από τη Dicer, παράγεται ένα τελικό μόριο RNA, μεγέθους ~22 νουκλεοτιδίων (Winter J. et al., 2009). Το ώριμο miRNA αλληλεπιδρά, τέλος, με ένα εξειδικευμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με το όνομα RISC, και σε συνεργασία επάγουν την αποδόμηση των mRNA στόχων είτε την καταστολή της μετάφρασής τους σε πρωτεΐνη, μέσω πρόσδεσης στις αμετάφραστες περιοχές αυτών (Calin GA. and Croce CM., 2006).



Εικόνα 9: Η βιογένεση των miRNAs

1.7.2 TA Micro-RNAs ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η θετική ή αρνητική επίδραση των διαφορετικών προτύπων έκφρασης των miRNAs έχουν μελετηθεί στα πλαίσια διερεύνησης και κατανόησης της παθογένειας πληθώρας πολυπαραγοντικών ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο καρκίνος. Παράλληλα, τα miRNAs έχουν μελετηθεί και ως πιθανοί διαγνωστικοί δείκτες και θεραπευτικοί στόχοι, παρόλο που η κλινική ανάπτυξη και παρασκευή φαρμάκων που θα στοχεύουν τα miRNA ή φαρμάκων με βάση τη θετική επίδραση των miRNAs βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο (Miyaki, S. and Asahara, H., 2012).

Σύγχρονες μελέτες της τελευταίας δεκαετίας αποκαλύπτουν τη συμμετοχή των miRNAs στη ρύθμιση της διαδικασίας της ανάπτυξης του μυοσκελετικού συστήματος, της χονδρογένεσης, της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και της διατήρησης της ομοιόστασης του αρθρικού χόνδρου. Έχει επίσης αναφερθεί πως ο ρόλος τους αυτός τα καθιστά ιδιαίτερος σημαντικά και στη διαδικασία της παθογένειας της OA, πιθανότατα λόγω του ρόλου που διαδραματίζουν στη διαβίβαση των τροποποιητικών επιπτώσεων στην ομοιόσταση των χονδοκυττάρων, μέσω της ρυθμιστικής τους δράσης σε εμπλεκόμενα γονίδια. Φαίνεται, δηλαδή, πως τα miRNAs αποτελούν ισχυρούς και ακριβείς ρυθμιστές της ορθής λειτουργίας των κυττάρων, μέσω του ρυθμιστικού τους ρόλου κατά την έκφραση γονιδίων-στόχων (Miyaki, S. and Asahara, H., 2012).

Πιο συγκεκριμένα, η OA έχει συσχετιστεί με την απορρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ των ομοιοστατικών μηχανισμών αποδόμησης και επιδιόρθωσης των ιστών της άρθρωσης, η οποία -σε φυσιολογικές συνθήκες- διατηρείται μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στην οποία συμμετέχουν ενεργά τα miRNAs (Miyaki, S. and Asahara, H., 2012). Επιπλέον, κατά την εκδήλωση της OA, η αρνητική επίδραση των παραγόντων κινδύνου δρώντας συνδυαστικά με τροποποιήσεις στη διαδικασία της μεταγραφής των γονιδίων και της επιγενετικής ρύθμισης, δύνανται να προκαλέσουν διαταραχή στη γονιδιακή σηματοδότηση και κατ' επέκταση στην έκφραση των miRNA-γονιδίων, οδηγώντας άλλοτε σε υπερέκφραση κι άλλοτε σε υποέκφραση αυτών (Esteller M., 2011). Τέτοιου είδους διαταραχές και τροποποιήσεις στην φυσιολογική έκφραση των miRNAs θα μπορούσε, ενδεχομένως, να χρησιμοποιηθεί προκειμένου τα miRNAs να αποτελέσουν πιθανούς προγνωστικούς δείκτες για την ασθένεια της OA (Miyaki, S. and Asahara, H., 2012).



Εικόνα 10: Τα miRNAs στην ΟΑ

Αρκετές σύγχρονες μελέτες έχουν διεξαχθεί με αντικείμενο την ταυτοποίηση miRNAs που σχετίζονται με το φαινότυπο της ΟΑ, παρουσιάζοντας διαφοροποίηση στα επίπεδα έκφρασής τους σε παθολογικούς (ΟΑ) ιστούς συγκριτικά με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Pliorou και συνεργατών, όπου με τη χρήση μεθόδων γενετικής, πρωτεωμικής και βιοπληροφορικής, ταυτοποιήθηκαν πιθανά γονίδια εμπλεκόμενα με την ΟΑ, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρούν κατά την παθογένεση της νόσου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, ταυτοποιήθηκαν και 16 miRNAs που, επίσης, συσχετίστηκαν με την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου (Pliorou D. et al., 2008).

1.8 TO Micro-RNA 140

Το miR-140 αποτελεί το καλύτερα μελετημένο miRNA, που εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο (cartilage specific). Το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση του miR-140 εδράζεται μεταξύ των εξωνίων 16 και 17 ενός γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη “Ε3 λιγάση της ουβικουΐτινης”, του *Wwp2*, το οποίο εντοπίζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 16 (16p) (Araldi E. and Schipani E., 2010). Όπως θα αναλυθεί σε επόμενη παράγραφο, σύγχρονες μελέτες έχουν αποκαλύψει τη συμμετοχή του miR-140 στη διαδικασία της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των χονδροκυττάρων, αλλά και την εμπλοκή του στην παθογένεση της ΟΑ.

1.8.1 TO miR-140 ΣΤΗ ΧΟΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΝΔΟΧΟΝΔΡΙΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ

Το 2009, οι Miyaki και συνεργάτες, απέδειξαν -με τη χρήση μικροσυστοιχιών- την ιστοειδική έκφραση του miR-140 στα χονδροκύτταρα. Παρατήρησαν αυξημένη έκφραση του miR-140 στα διαφοροποιημένα χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα επίπεδα έκφρασής του στα αποδιαφοροποιημένα και τα μεσεγχυματικά (MSCs), σε αντιστοιχία με το πρότυπο έκφρασης των SOX9 και COL2A1, τα οποία εκφράζονται, κυρίως, κατά τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (χονδρογένεση) (Miyaki S. et al., 2009). Σε πρόσφατες μελέτες, αποδεικνύεται ο ρυθμιστικός ρόλος που κατέχει ο μεταγραφικός παράγοντας SOX9 (αλλά και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας SOX) στη διαδικασία της έκφρασης του miR-140 στον αρθρικό χόνδρο (Yamashita S. et al., 2012), (Yang J. et al., 2011), (Nakamura Y et al., 2012), μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt/ β -catenin (Zhang R. et al., 2013). Επιπλέον έχει βρεθεί πως το miR-140 συμμετέχει στην αρνητική ρύθμιση μορίων αποδόμησης της ECM (πχ. MMP13), όπως επίσης και μορίων που επιδρούν στη δράση αναβολικών παραγόντων των χονδροκυττάρων (πχ. IGFBP-5) (Tardif G. et al., 2009).

Το miR-140 φαίνεται πως συμμετέχει και στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση (ΕΟ), ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη διαδικασία. Παραδείγματος χάριν, σχετική έρευνα έχει αποκαλύψει πως το miR-140 συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης της από-ακετυλάσης των ιστονών 4 (HDAC4) (Tuddenham L. et al., 2006), η οποία αποτελεί αναστολέα μορίων που εμπλέκονται στην ΕΟ, όπως των RUNX2 και Smad3 (Pais H. et al., 2010). Επιπλέον, από μελέτες σε miR-140-knock-out ποντίκια, έχει βρεθεί πως ανταγωνιστές των σηματοδοτικών μονοπατιών όπου συμμετέχουν οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs), όπως για παράδειγμα η πρωτεΐνη Dnrep, υπερεκφράζονται προτείνοντας τον πιθανό ρυθμιστικό ρόλο του miR-140 στη δράση αυξητικών παραγόντων κατά τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (Nakamura Y et al., 2011), (Nicolas FE. et al., 2011).

Ωστόσο, η υπάρχουσα γνώση δεν αρκεί προκειμένου να χαρακτηριστεί με ακρίβεια ο ρυθμιστικός ρόλος του miR-140 στην ομοίωση και την ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου, όπως επίσης και η πιθανή εμπλοκή του στην παθογένεση ασθενειών του μυοσκελετικού συστήματος και των αρθρώσεων, όπως η ΟΑ.

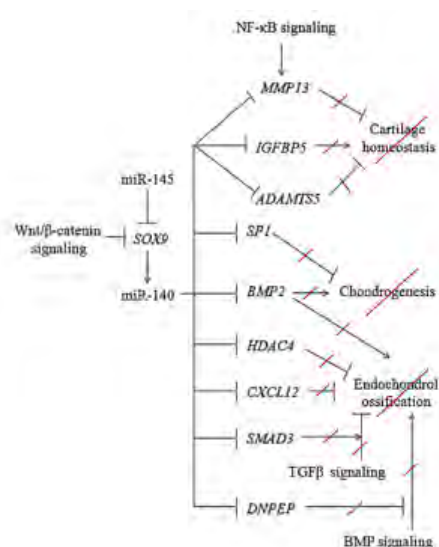
1.8.2 TO miR-140 ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Η συμμετοχή του miR-140 στην παθογένεση της ΟΑ έχει αποδειχθεί από το 2008. Στη μελέτη των Iliopoulos και συνεργατών, μεταξύ των 16 miRNAs που συσχετίστηκαν με την εκδήλωση της ΟΑ, και μάλιστα μεταξύ των 7 που βρέθηκαν να υποεκφράζονται,

ταυτοποιήθηκε και το miR-140. Το προαναφερθέν επιβεβαιώθηκε αργότερα και από άλλες σχετικές ερευνητικές μελέτες όπως των Miyaki και συνεργατών, και των Tardif και συνεργατών (Miyaki S. et al., 2009), (Tardif G. et al., 2009).

Όπως προαναφέρθηκε, το miR-140 συμμετέχει σε κρίσιμες διεργασίες της χονδρογένεσης και της ΕΟ, ρυθμίζοντας τη δράση εμπλεκόμενων γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων. Επομένως, η πιθανή τροποποιητική επίπτωση στη ρυθμιστική δράση του miR-140 θα μπορούσε να διαταράξει την ομοιόσταση των χονδροκυττάρων και να εντείνει την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου. Πράγματι, εντός της τελευταίας δεκαετίας, ένας μεγάλος αριθμός σχετικών ερευνών έχει αποκαλύψει την συμμετοχή του miR-140 στις καταβολικές διεργασίες εκφυλισμού του αρθρικού χόνδρου.

Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται πως το miR-140 στοχεύει και καταστέλλει πρωτεϊνικά μόρια αποδόμησης της ECM, λειτουργία η οποία διαταράσσεται στην ΟΑ (Zhang R. et al., 2013) πιθανότατα λόγω μείωσης της έκφρασης του (Πιορούλος D. et al., 2008), με αποτέλεσμα τα καταβολικά αυτά μόρια να υπερλειτουργούν, αποδομώντας την ECM και εκφυλίζοντας το χόνδρινο ιστό. Βασικά καταβολικά μόρια-στόχοι του miR-140 έχουν χαρακτηριστεί η αγκρεκανάση ADAMTS-5 (Miyaki S. et al., 2010), η μεταλλοπρωτεϊνάση MMP-13 (Liang ZJ et al., 2012). Επιπλέον, στόχο για το miR-140 αποτελεί και ο IGFBP-5 παράγοντας, ο οποίος σε φυσιολογικούς ιστούς ελέγχει τη δράση του αναβολικού αυξητικού παράγοντα IGF-1, και που σε ΟΑ ιστούς έχει παρουσιάσει σημαντικά ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης (Tardif G. et al., 2009). Η Εικόνα 11 συνοψίζει τα μόρια που υπόκεινται σε γονιδιακή ρύθμιση μέσω του miR-140, τις διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται, καθώς και τα ανοδικά και καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στις διεργασίες αυτές. Στην ΟΑ, η υποέκφραση του miR-140 συντελεί στην απορρύθμιση των συγκεκριμένων μηχανισμών (Zhang R. et al., 2013).



Εικόνα 11: Το miR-140 στην ΟΑ (η κόκκινη γραμμή δηλώνει τη διαταραχή της κάθε φυσιολογικής διεργασίας)

1.9 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ SNPs ΚΑΙ Micro-RNAs

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (single-nucleotide polymorphisms, SNPs), αποτελούν τους πιο κοινούς και συχνά εμφανιζόμενους γενετικούς πολυμορφισμούς που συντελούν στη μεγάλη ετερογένεια που παρουσιάζει το γενετικό υλικό για το κάθε άτομο. Ολοένα και περισσότερες επιστημονικές έρευνες στρέφουν το ενδιαφέρον τους στη μελέτη του τρόπου με τον οποίο είναι δυνατό τα SNPs να επηρεάζουν το πρότυπο κληρονόμησης διαφόρων χαρακτηριστικών, καθώς και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Dole NS. and Delany AM., 2015).

Σύμφωνα με σύγχρονες αναφορές, φαίνεται πως τα SNPs πιθανότατα εμπλέκονται και στη ρύθμιση της έκφρασης και της λειτουργίας των mi-RNAs. Ειδικότερα, έχει βρεθεί πως τα SNPs εντοπίζονται είτε εντός της αλληλουχίας του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του εκάστοτε mi-RNA (miR-SNPs) (Duan R. et al., 2007), είτε απαντώνται ως τμήμα της αλληλουχίας στόχου (targeting site, TS) των ώριμων mi-RNAs (miR-TS-SNPs) (Saunders MA. et al., 2007).

Τα miR-TS-SNPs εντοπίζονται εντός ή παρακείμενα της θέσης-στόχου/πρόσδεσης του miRNA, στο γονίδιο που πρόκειται να εκφραστεί σε πρωτεΐνη, προκαλώντας, με τον τρόπο αυτό, τη δημιουργία ή την αποσιώπηση πιθανής θέσης στόχου πάνω στο mRNA, για το αντίστοιχο mi-RNA (Mishra PJ. et al., 2008). Ωστόσο, προκειμένου τα miR-TS-SNPs να έχουν λειτουργική φαινοτυπική επίπτωση θα πρέπει να συνυπολογιστεί η ιστοειδικότητα στην έκφραση του αντίστοιχου mi-RNA, καθώς και η πιθανή έκφραση αντισταθμιστικών mi-RNAs. Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνεται μόνο όταν το ρυθμιστικό mi-RNA εκφράζεται στον ίδιο ιστό με το γονίδιο -άρα και το mRNA- στόχο. Επομένως, προκειμένου το miR-TS-SNP να επιφέρει λειτουργική συνέπεια, θα πρέπει να ισχύει η προαναφερθείσα συνθήκη. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί πως η μελέτη του τρόπου με τον οποίο τα miR-TS-SNPs δύνανται να τροποποιούν τη φαινοτυπική έκφραση, θα μπορούσε να εξηγήσει -ως ένα βαθμό- την ιστοειδική εκδήλωση φαινοτύπων σε συσχετισμό με την ύπαρξη ορισμένων κοινών πολυμορφισμών SNPs (Arnold M. et al., 2012).

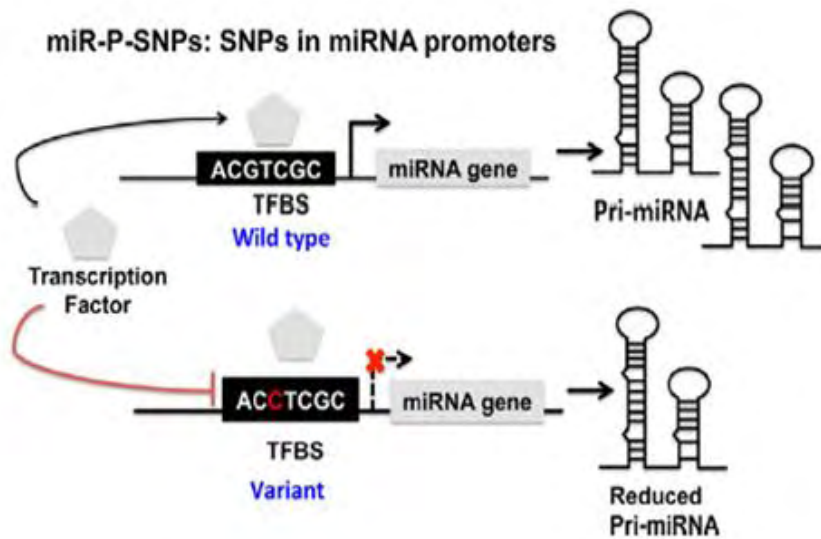
Όσον αφορά τα miR-SNPs, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, εντοπίζονται εντός της αλληλουχίας των γονιδίων των διαφόρων mi-RNAs. Ενδιαφέρον προκαλεί το εξής: δεδομένου ότι ένα mi-RNA δύναται να στοχεύσει πολλά γονίδια στόχους σε διαφορετικούς ιστούς, είναι πιθανό πως η ύπαρξη ενός miR-SNP για ένα miRNA θα μπορούσε να προκαλέσει τροποποιητικές διαταραχές που θα επηρέαζαν όλα τα ρυθμιστικά μοριακά μονοπάτια στα οποία εμπλέκεται το συγκεκριμένο miRNA. Κάτι τέτοιο, ωστόσο, αφορά μόνο ένα μικρό ποσοστό των ταυτοποιημένων mi-RNAs, για το ανθρώπινο γονιδίωμα. Κι αυτό, καθώς σύμφωνα με τα σύγχρονα δεδομένα, μόνο στο ~10% των miRNA-γονιδίων φαίνεται

να εντοπίζονται τέτοιου είδους πολυμορφισμοί, με <1% αυτών να εδράζονται εντός της αλληλουχίας του καθαυτού γονιδίου (Dole NS. and Delany AM., 2015). Τα miR-SNPs μπορεί να εντοπίζονται, επίσης, και εντός της αλληλουχίας των υποκινητών (promoters) των miRNA-γονιδίων (miR-P-SNPs) (Luo X et al., 2011), ενώ, όπως προκύπτει από βάσεις δεδομένων, μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί ~20,000 επικρατείς πολυμορφισμοί miR-P-SNPs (Dole NS. and Delany AM., 2015).

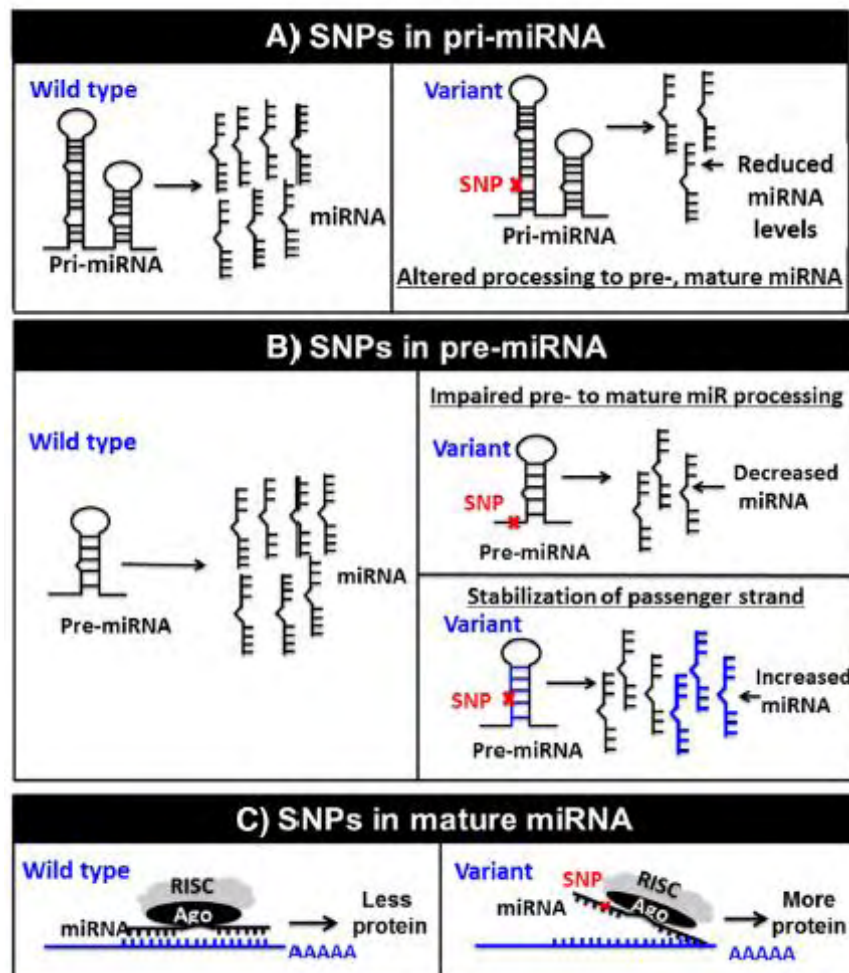
Τα miR-SNPs επεμβαίνουν στη βιογένεση και την ωρίμανση των miRNAs, αφού επιδρούν στην επεξεργασία των pri-miRNA (πρώιμο), pre-miRNA (πρόδρομο) και mature (ώριμο) miRNA, μεταβάλλοντας, συνήθως, τη δευτεροταγή δομή και αποσταθεροποιώντας τα pri- και pre-miRNAs. Ωστόσο, είναι πιθανό να οδηγούν και σε αυξημένη σταθεροποίηση της αλυσίδας-συνοδού (passenger strand), δίνοντας τελικά δύο αλυσίδες-οδηγούς (guide strands) αντί μίας, που και οι δύο θα δημιουργήσουν σύμπλοκο με τη RISC προκειμένου να προσδεθούν στο mRNA-στόχο (Duan R. et al., 2007). Τέτοιου είδους τροποποιητικές επιδράσεις των miR-SNPs οδηγούν σε μείωση είτε αύξηση των μεταγράφων των miRNAs, εναλλακτικά, ωστόσο, δύνανται να επηρεάσουν και την ποσότητα της παραγώμενης πρωτεΐνης, όταν εντοπίζονται στην περιοχή πρόσδεσης του συμπλόκου RISC-miRNA στην αλληλουχία στόχο (Dole NS. and Delany AM., 2015). Αντίστοιχα, τα miR-P-SNPs δύνανται να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση με τρεις τρόπους: δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (transcription factor binding sites, TFBS), αποσιωπώντας TFBS ή τροποποιώντας την ικανότητα πρόσδεσης αυτών στην αλληλουχία/γονίδιο/υποκινητή-στόχο (Luo X et al., 2011).



Εικόνα 12: Τα miR-TS-SNPs



Εικόνα 13: Τα miR-P-SNPs



Εικόνα 14: Τα miR-SNPs

Λαμβάνοντας ως δεδομένη την πολυπαραγοντική αιτιολογία των παθήσεων του μυοσκελετικού συστήματος (πχ. Οστεοπόρωση, ΟΑ, κ.ά.), θα μπορούσαμε να πούμε πως η μελέτη του γονιδιακού προφίλ αυτών, σε συνδυασμό με επαρκείς γνώσεις σχετικά με την ύπαρξη και την επίδραση πολυμορφισμών SNPs σχετιζόμενων με τα miRNAs, θα ενίσχυε σημαντικά την ακρίβεια των επιστημονικών ευρημάτων και θα βοηθούσε στην πιο ολοκληρωμένη κατανόηση της αιτιοπαθογένειας των νοσημάτων αυτών. Πράγματι, ολοένα και περισσότερες μελέτες GWAS προσανατολίζονται στη μελέτη γενετικών τόπων που σχετίζονται με παράγοντες κινδύνου για τα νοσήματα αυτά –π.χ. μελέτες για την οστική πυκνότητα (bone mineral density, BMD) (Coronello C et al., 2012)-, λαμβάνοντας υπόψιν και την ύπαρξη SNPs εντός γονιδίων-miRNA, αλλά και εντός μεταφραζόμενων και μη περιοχών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η σχετική δημοσιευμένη γνώση είναι αρκετά περιορισμένη (Dole NS. and Delany AM., 2015).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του miRNA-140 στην ΟΑ. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε:

- Μελέτη της έκφρασης του miR-140 σε διάφορους ιστούς της άρθρωσης όπως αρθρικός χόνδρος, αρθρικός υμένας και μηνίσκος ατόμων με οστεοαρθρίτιδα
- Αναζήτηση γονιδίων-στόχων για το miR-140 με χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής
- Μελέτη της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και ρυθμίζονται από το miR-140 (όπως BMP-2 και HDAC4), μετά από επίδραση του miR-140 σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων
- Γονοτυπική ανάλυση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140 σε άτομα με οστεοαρθρίτιδα και σε υγιή άτομα με σκοπό την πιθανή ανάδειξη του στη ρύθμιση του miR-140 και την πιθανή εμπλοκή του στην παθογένεια της ΟΑ.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Τα δείγματα αρθρικού χόνδρου, μηνίσκου και αρθρικού υμένα που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα μελέτη ελήφθησαν από μηριαίους και κνημιαίους κονδύλους ασθενών με πρωτοπαθή οστεοαρθρίτιδα, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση ολικής αρθροπλαστικής γόνατος στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Επιπλέον, από όλους τους ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, ελήφθη υπό άσηπτες συνθήκες -εντός του χειρουργείου- αρθρικό υγρό και περιφερικό αίμα.

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν 60 δείγματα, τα οποία προήλθαν από τους εξής αρθρικούς ιστούς:

- Αρθρικός χόνδρος: 30 δείγματα (εκ των οποίων 20 OA, 10 φυσιολογικά)
- Αρθρικός υμένας: 20 δείγματα OA (εκ των οποίων 16 OA, 4 φυσιολογικά)
- Μηνίσκος: 10 δείγματα OA

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη απομονώθηκαν από τις αντίστοιχες περιοχές της άρθρωσης που εμφάνιζαν σοβαρού βαθμού αλλοιώσεις, δηλαδή, OA σε προχωρημένο στάδιο. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 14 άτομα χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης σοβαρού κατάγματος ή ακρωτηριασμού. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν δείγματα ασθενών με σηπτική OA, μετα-τραυματική OA, ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα προκαλούμενη από την εκδήλωση κάποιου άλλου αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς και χονδροδυσπλασία.

Αναλυτικά κλινικά στοιχεία κάθε ασθενούς συμπληρώθηκαν σε ειδική φόρμα και αφορούσαν δεδομένα όπως: φύλο, ηλικία, βαθμός φυσικής κατάστασης, δείκτης μάζας σώματος (Body Mass Index, BMI), παρουσία πόνου, δυσκαμψίας, οστεοφύτων, διόγκωσης της άρθρωσης, όπως επίσης και παρουσία κάποιου άλλου νοσήματος. Επιπλέον, πριν την χειρουργική επέμβαση της ολικής αρθροπλαστικής, πραγματοποιήθηκαν ακτινογραφικοί έλεγχοι των ασθενών, ενώ, η εκτίμηση των ευρημάτων έγινε με τη χρήση του συστήματος βαθμολόγησης Kellgren-Lawrence (K/L score). Η ταξινόμηση της OA από τα ακτινολογικά ευρήματα έγινε βάσει μιας κλίμακας 5 βαθμίδων (0-4), η οποία παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Όλα τα δείγματα των φυσιολογικών αρθρικών χόνδρων βαθμολογήθηκαν με K/L score = 0.

Τέλος, για τη μελέτη διαχωρισμού των αλληλομόρφων χρησιμοποιήθηκε δείγμα περιφερικού αίματος από συνολικά 1.704 συμμετέχοντες, εκ των οποίων οι 965 ήταν ασθενείς με OA ενώ οι 739 δεν παρουσίαζαν συμπτώματα πάθησης των αρθρώσεων (φυσιολογικά δείγματα).

ΒΑΘΜΙΔΑ	0	I	II	III	IV
ΚΡΙΤΗΡΙΑ	Φυσιολογική άρθρωση	Ελάχιστα οστεόφυτα	Σαφή οστεόφυτα	Οστεόφυτα, στένωση αρθρικού διαστήματος	Οστεόφυτα, στένωση αρθρικού διαστήματος, σκλήρυνση υποχόνδριου οστού

3.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Για την απομόνωση και την καλλιέργεια των χονδροκυττάρων και των κυττάρων μηνίσκου και αρθρικού υμένα, χρησιμοποιήθηκε τμήμα αρθρικού χόνδρου που ελήφθη άσηπτα κατόπιν χειρουργικής επέμβασης. Τα κύτταρα απελευθερώθηκαν από το τμήμα του αρθρικού χόνδρου με τη βοήθεια ενζυμικής διάσπασης, ενώ για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιήθηκαν ειδικές φλάσκες των 25cm³, καθώς και κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη τους πραγματοποιήθηκε -υπό κατάλληλες συνθήκες υγρασίας- σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments), με σταθερή θερμοκρασία στους 37°C και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό στείρο περιβάλλον, ενώ όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν εντός απαγωγού εστίας κάθετης νηματικής ροής, για την αποφυγή εξωτερικών επιμολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων της καλλιέργειας έγινε με χρήση μικροσκοπίου ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

3.2.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium/ Ham's F-12 (DMEM/F-12, GIBCO BRL, UK). Πριν τη χρήση, το θρεπτικό υλικό εμπλουτίστηκε με προσθήκη ορού εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) σε αναλογία 10% του όγκου του θρεπτικού DMEM, ο οποίος περιέχει αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη penicillin-streptomycin, P/S) σε αναλογία 1% του όγκου του θρεπτικού, καθώς και παράγοντες που συμβάλλουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.
- Ρυθμιστικό διάλυμα PBS (HyClone)
- Προνάση (Roche)

- Κολλαγενάση (Roche)

3.2.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

- Έκπλυση του ιστού με ρυθμιστικό διάλυμα PBS για καθαρισμό από υπολείμματα του χειρουργείου, και τεμαχισμός με αποστειρωμένο νυστέρι
- Προσθήκη 5mg/ml προνάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 30min
- Αφαίρεση υπερκείμενου υγρού, προσθήκη 5mg/ml κολλαγενάσης σε 2ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο για 90min
- Μεταφορά υπερκείμενου σε πλαστικό σωληνάριο (falcon) των 15ml και φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 7min σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 5ml πλήρους θρεπτικού υλικού
- Επαναιώρηση του ιζήματος, μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25cm³ και επώαση στον κλίβανο

Τα κύτταρα σε αρχική φάση εντοπίζονται ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό. Κατόπιν 2 ημερών προσκολλώνται στον πάτο της φλάσκας και αποκτούν διαφορετικό σχήμα. Όταν ο πληθυσμός των κυττάρων αυξανόταν τόσο ώστε να καλύπτουν την επιφάνεια της φλάσκας ακολουθούσε είτε ανακαλλιέργεια αυτών στις προκαθορισμένες συνθήκες, είτε χρησιμοποιούνταν για απομόνωση RNA και για την πραγματοποίηση των επιδράσεων με διάφορες χημικές ουσίες.

Όσον αφορά την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, η διαδικασία πραγματοποιούνταν κάθε 7 ημέρες περίπου, και εξαρτιόταν από το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απομονώνονταν, στη φάση όπου τα κύτταρα είχαν αυξηθεί σε πληθυσμό και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά την ολοκλήρωση 1 έως 2 ανακαλλιεργειών τα κύτταρα τοποθετούνταν σε κατάψυξη και διατηρούνταν για μελλοντική χρήση.

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων προϋποθέτει την αποκόλληση τους από την επιφάνεια της φλάσκας. Αρχικά, γινόταν αφαίρεση του καλλιεργητικού θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα, έκπλυση με 5ml PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ και τέλος προσθήκη 1ml θρυψίνης. Η θρυψίνη, χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό καθώς αποτελεί ένζυμο που προκαλεί διάσπαση των συνδέσεων των κυττάρων στην επιφάνεια προσκόλλησής τους, επομένως επιτρέπει την αποκόλληση αυτών προκειμένου να μπορέσουν να συλλεχθούν. Οι φλάσκες τοποθετούνταν στον επωαστικό κλίβανο για περίπου 5min (μέγιστος χρόνος 10min), ούτως ώστε τα κύτταρα να αποκολληθούν, ενώ η αποκόλλησή τους ελεγχόταν στο μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης. Κατόπιν, πραγματοποιούνταν διακοπή της δράσης της θρυψίνης και άμεση προσθήκη

θεραπευτικού υλικού σε ποσότητα δεκαπλάσια αυτής της θρυψίνης, και ακολουθούσαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις για την τελική συλλογή κυττάρων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με χρήση της πλάκας Newbauer: ανάμιξη 20μl από το αρχικό εναιώρημα με 20 μl Trypan Blue και τοποθέτηση πάνω στην πλάκα. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη φέρει αλλοιώσεις (πχ. αποπτωτικά ή/και νεκρωτικά κύτταρα). Συνεπώς, τα υγιή κύτταρα δεν χρωματίζονται από τη χρωστική και μετρούνται ώστε να υπολογιστεί η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος. Κατόπιν, γίνεται τοποθέτηση των κυττάρων σε νέες φλάσκες, σε συγκέντρωση $1-2 \times 10^6$ κύτταρα/ml φρέσκου θεραπευτικού υλικού.

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα μεταφέρονται σε ειδικό κρυοφυαλίδιο, σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6$ κύτταρα/ml θεραπευτικού υλικού, εμπλουτισμένου με 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS, απουσία αντιβιοτικών. Το DMSO συμβάλλει στην αργή ψύξη κυττάρων-θεραπευτικού υλικού, ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία κρυστάλλων οι οποίοι θα κατέστρεφαν πιθανότατα την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σε τρεις φάσεις: τοποθέτηση του φιαλιδίου αρχικά στους -20°C για 4h, έπειτα στους -80°C για 24h και, τέλος, φύλαξη στους -150°C .

Όταν είναι η στιγμή να χρησιμοποιηθούν τα κύτταρα για απομόνωση RNA ή/και επιδράσεις με διάφορες ουσίες, πραγματοποιείται, αρχικά, απόψυξη αυτών, διαδικασία η οποία -σε αντίθεση με την κατάψυξη- γίνεται γρήγορα. Το κρυοφυαλίδιο τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C και το περιεχόμενο μεταφέρεται άμεσα σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Ακολουθεί φυγοκέντρωση του σωληναρίου για 5min, απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Τέλος, το περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρεται σε φλάσκα των 25ml ώστε να τοποθετηθεί στον επωαστικό κλίβανο.

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ ΑΡΘΡΩΣΗΣ

3.3.1 ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ RNA

- Trizol (Life Technologies)
- Χλωροφόρμιο (Merck)
- Ισοπροπυλική αλκοόλη (Amresco)
- 70% αιθανόλη (Scharlau)
- RNase-free water (Qiagen)
- PBS (HyClone)
- Θρυψίνη (Life Technologies)

3.3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ RNA

- Απομόνωση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα
- Ξέπλυμα των κυττάρων με 5ml PBS (x2)
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και επώαση για 2-3min στον κλίβανο
- Αποκόλληση των κυττάρων και προσθήκη 5ml θρεπτικού στη φλάσκα, ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης
- Μεταφορά του περιεχομένου της φλάσκας σε πλαστικό σωληνάριο
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 2000rpm για 7min, σε θερμοκρασία δωματίου (x2)
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml HBSS
- Φυγοκέντρηση των κυττάρων στα 2.000rpm για 7min, σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 1-3ml Trizol, αναλόγως του μεγέθους του ιζήματος των κυττάρων
- Επώαση για 5min στους 15-30°C στο υδατόλουτρο
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφορμίου για κάθε 1ml Trizol και καλή ανάδευση για 15sec
- Επώαση για 2-3min στους 15-30°C στο υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στα 3.500rpm για 15min, στους 4°C
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε Eppendorf των 2ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol
- Επώαση για 10min στους 15-30°C στο υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στα 12.000rpm για 10min, στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του RNA με 1ml 70% αιθανόλης
- Ανάδευση με vortex και φυγοκέντρηση στα 10.000rpm για 10min, στους 4°C
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα RNA σε θερμοκρασία δωματίου, κάτω από την απαγωγό εστία, μέχρι να εξατμιστεί επαρκώς η αιθανόλη
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl)
- Επώαση για 10min στους 55-60°C στο υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του RNA στους -80 °C

Επίσης, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ποιότητας του απομονωμένου RNA έπειτα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή (gel) αγαρόζης, συγκέντρωσης 2%.

3.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA)

Από τα RNA που απομονώθηκαν για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) για το κάθε γονίδιο ξεχωριστά (U6, miR-140). Το U6 χρησιμοποιήθηκε ως «γονίδιο αναφοράς», επειδή εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους.

3.4.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (1ος κύκλος)

- Stem loop: 1μl
- ddH₂O: 11μl

Stem loop U6: 5'-CACGGAAGCCCTCACACCGTGTCTCGTTC-3'

Stem loop miR-140: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG

TATTCGCACTGGATACGACCTACCA-3'

3.4.2 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA (2ος κύκλος)

- 5x Buffer: 4μl
- dNTPs: 2μl
- M-MLV: 1μl

3.4.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 1μl RNA από κάθε δείγμα, ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20μl. Ειδικότερα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Παρασκευή cDNA1 mix και διάλυση 1μl RNA σε αυτό (C_{TEA}: 13μl)
- Θέρμανση του μίγματος στους 65°C για 5min (1^{ος} κύκλος)
- Τα δείγματα παρέμειναν για 5min στον πάγο, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση
- Παρασκευή cDNA2 mix και προσθήκη 7μl αυτού σε καθένα από τα σωληνάρια της cDNA1 (C_{TEA}: 7μl)
- Το διάλυμα της αντίδρασης ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα (2^{ος} κύκλος):
 - 37°C, 60min
 - 94°C, 2min
 - Τελική θερμοκρασία 4 °C

3.5 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real time PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) βασίζεται στην ενζυματική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και κατάλληλων εκκινητών, *in vitro*. Η Taq πολυμεράση αποτελεί μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, η οποία προέρχεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές αποτελούν μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (ολιγονουκλεοτίδια), οι οποίες έχουν την ιδιότητα να υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος DNA που στοχεύουμε να ενισχύσουμε. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA, θα πρέπει το μίγμα της αντίδρασης (PCR mix) να περιέχει τα εξής: τη δίκλωνη αλυσίδα του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, το ένζυμο Taq πολυμεράση, το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα για το ένζυμο, το ζεύγος των εκκινητών (Forward/Reverse), το διάλυμα των ελευθέρων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) που θα χρησιμοποιήσει η πολυμεράση και, τέλος, διάλυμα $MgCl_2$ το οποίο διευκολύνει τη διαδικασία της αντίδρασης.

Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μια αντίστοιχη τεχνική η οποία επιτρέπει την αξιόπιστη ανίχνευση και παράλληλα μέτρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR για κάθε κυτταρικό κύκλο, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσοστό του αρχικού μητρικού μορίου DNA, κατά την έναρξη της PCR. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα ποσοτικοποίησης αποτελεί το σύστημα ABI 7300 (Applied Biosystems). Η βασική αρχή του συστήματος στηρίζεται στη χρήση ειδικών φθορίζουσών χημικών ουσιών και την ανίχνευση του φθορισμού αυτών, που εκπέμπεται κατά την ενσωμάτωσή τους στο DNA του δείγματος.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία SYBR Green (μέγιστη απορρόφηση στα 497nm), η οποία έχει την ικανότητα να συνδέεται σε δίκλιωνα μόρια DNA, ενισχύοντας το φθορισμό της και επιτρέποντας στο σύστημα καταγραφής την ανίχνευση των επιθυμητών PCR προϊόντων. Η συγκεκριμένη φθορίζουσα ουσία, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την αποτελεσματικότερη πραγματοποίηση της αντίδρασης της real-time PCR, καθώς δύναται να συνδεθεί σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA αλλά μόνο σε μία συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ευαισθησία της μεθόδου. Παράλληλα, ο υπολογισμός του φθορισμού της SYBR Green σε αυξανόμενες θερμοκρασίες, μειώνει την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων.

Η διαδικασία της PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-35), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94-95°C
- Σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα (3'-5') της μονόκλωνης ακολουθίας στόχου που προέκυψε στο προηγούμενο στάδιο, σε θερμοκρασία ανάλογη της σύνθεσης των εκκινητών
- Θέρμανση του μίγματος στους 68-72°C, προκειμένου η Taq πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου, με τη χρήση των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές

Η χρονική διάρκεια κάθε σταδίου δεν είναι συγκεκριμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από το μήκος (bp) του DNA-τμήματος που πρόκειται να ενισχυθεί. Με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ~1.000.000 αντιγράφων της μητρικής αλληλουχίας, αφού στο τέλος κάθε κύκλου του το προϊόν της αντίδρασης διπλασιάζεται.

3.5.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗΝ **real-time PCR**

- cDNA για U6 και miR-140
- Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τη SYBR Green και ROX (Fermentas)
- Εκκινητές (5μM) για τα γονίδια U6 και miR-140
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (DEMO S.A.)

3.5.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ U6 & miR-140

Το διάλυμα της αντίδρασης (PCR mix) περιείχε:

- cDNA: 3μl
- SYBR Green: 10μl
- Εκκινητής Forward: 0,5μl
- Εκκινητής Reverse: 0,5μl
- ddH₂O: 6μl

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο ήταν οι εξής:

Primers U6:

Forward- 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'

Reverse- 5'-CTCACACCGTGTCTGTTCCA-3'

Primers miR-140:

Forward- 5'-GCCTCAGTGGTTTTACCCTA-3'

Reverse- 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων ήταν οι εξής:

- Αποδιάταξη στους 95°C
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε 3 στάδια:
 - Αποδιάταξη στους 95°C για 15sec
 - Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 60°C για 60sec
 - Επιμήκυνση στους 72°C για 30sec
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10min

3.6 ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΕΥΡΕΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ-ΣΤΟΧΩΝ ΓΙΑ ΤΟ miR-140

Η εύρεση γονιδίων-στόχων για το miR-140 έγινε με τη χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής, κατόπιν αναζήτησης σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: miRWalk, miRanda, RNA22, Targetscan.

3.7 ΑΠΟΣΙΩΠΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ Micro-RNAs

Η τεχνολογία των μικρών παρεμβατικών μορίων RNA αποτελεί μια αρκετά σύγχρονη προσέγγιση με στόχο την αναστολή της έκφρασης γονιδίων που έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση νοσημάτων. Στα πλαίσια εφαρμογής τέτοιων μεθόδων γίνεται λόγος, κυρίως, για τη χρήση siRNAs και micro-RNAs, ενώ η επιμόλυνση των κυττάρων με τα εξωγενή αυτά μόρια γίνεται με τη χρήση κατάλληλου φορέα (πλασμίδια ή λιποσώματα). Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε αναστολή της έκφρασης επιλεγμένων γονιδίων (BMP-2 και HDAC4) με αποδεδειγμένη -με βάση πληροφορίες από σχετικές βιβλιογραφικές πηγές- συμμετοχή στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, με τη χρήση micro-RNAs, με σκοπό την ταυτοποίηση μοριακών μονοπατιών που εμπλέκονται στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και του υπερτροφικού φαινοτύπου των χονδροκυττάρων, στην οστεοαρθρίτιδα. Οι επιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε κυτταρικές σειρές OA χονδροκυττάρων. Το μόριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το miR-140, ενώ προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επιμόλυνση των κυττάρων με το συγκεκριμένο εξωγενές μόριο έγινε χρήση του λιποσωμικού φορέα lipofectamin (λιποφεκταμίνη). Το συγκεκριμένο μόριο συντελεί στην ενδοκύττωση του miR-140 στο εσωτερικό των κυττάρων -προκειμένου να καταστείλει την έκφραση των γονιδίων-στόχων- λόγω του ότι έχει λιπιδιακή κατιονική δομή,

γεγονός που προσφέρει υψηλή αποτελεσματικότητα επιμόλυνσης στις εκάστοτε κυτταρικές σειρές. Κάθε δείγμα το οποίο υποβλήθηκε στο πρωτόκολλο αποσιώπησης της γονιδιακής έκφρασης μελετήθηκε εις διπλούν, προκειμένου να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

3.7.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ miR-140 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

- LipofectaminTM2000 (Invitrogen)
- Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen)
- Micro-RNA 140 (Qiagen): -5' CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG 3'-

3.7.2 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ miR-140 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μια ημέρα πριν την επιμόλυνση των κυτταρικών σειρών με το miR-140, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε ειδικό πιάτο με 6 πηγαδάκια (6-well plate) και προστέθηκαν 2ml θρεπτικού υλικού DMEM/F άνευ FBS και αντιβιοτικών. Ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε στείρες συνθήκες στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 24h. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα από συνολικά 6 πηγαδάκια ως δείγματα ελέγχου στα οποία δεν έγινε επιμόλυνση με miR-140. Στα υπόλοιπα πηγαδάκια έγινε επιμόλυνση των κυττάρων, ενώ η συγκέντρωση λιποφεκταμίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30nM για τα μισά πηγαδάκια και 40nM για τα υπόλοιπα. Για τα μισά πηγαδάκια 30nM και 40nM, η επώαση κατόπιν της επιμόλυνσης διήρκεσε 24h, ενώ για τα υπόλοιπα 48h.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- Προσθήκη 3μl λιποφεκταμίνης σε 497μl DMEM/F άνευ FBS και αντιβιοτικών
- Καλή ανάδευση με πιπέττα Pasteur
- Προσθήκη 3μl miR-140 σε 497μl DMEM/F άνευ FBS και αντιβιοτικών
- Καλή ανάδευση με πιπέττα Pasteur
- Επώαση των δύο διαλυμάτων για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
- Ανάμειξη του διαλύματος της λιποφεκταμίνης με εκείνου το miR-140
- Καλή ανάδευση με πιπέττα Pasteur
- Επώαση του μίγματος για 20min σε θερμοκρασία δωματίου
- Απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού από όλα τα πηγαδάκια και ξέπλυμα με PBS (x2)
- Μεταφορά 1ml σε κάθε πηγαδάκι (εκτός των πηγαδιών που περιείχαν τα δείγματα ελέγχου) από το μίγμα λιποφεκταμίνης/miR-140

- Προσθήκη 1ml DMEM/F άνευ FBS και αντιβιοτικών στα επιμολυσμένα πηγαδάκια και 2ml DMEM/F άνευ FBS και αντιβιοτικών στα πηγαδάκια-ελέγχου
- Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο για 24h
- Απομόνωση των κυττάρων από τα μισά πηγαδάκια με χρήση Trizol (Life Technologies) και ξέπλυμα μόνο αυτών των πηγαδιών με PBS προκειμένου να αποφευχθεί η επίδραση του Trizol στα διπλανά πηγαδάκια λόγω ανεπιθύμητης επιμόλυνσης.
- Επώαση των υπόλοιπων κυττάρων για άλλες 24h (48h συνολικά) και επανάληψη της διαδικασίας απομόνωσης τους με Trizol
- Τα κύτταρα που απομονώθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση RNA (με βάση το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε παραπάνω)

3.8 ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA (cDNA) ΓΙΑ ΤΑ BMP-2 & HDAC4

Τα RNA που απομονώθηκαν (με το πρωτόκολλο που περιεγράφηκε παραπάνω) μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο αντίστροφης μεταγραφής *in vitro*. Ως εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers), καθώς και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης.

3.8.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

- Random hexamers (2,97 µg/µL, invitrogen)
- Kit αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript III (200U/µL, invitrogen)
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs 50mM, invitrogen)
- Δις απεσταγμένο νερό ddH₂O (DEMO S.A.)

3.8.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΣΥΝΘΕΣΗΣ cDNA

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 1µgr RNA από κάθε δείγμα, ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25µl. Ειδικότερα ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Διάλυση RNA σε ddH₂O και προσθήκη 1µl Random Primers μέχρι τελικού όγκου 15µl.
- Θέρμανση του δείγματος στους 70°C για 10min, για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των μορίων RNA.
- Προσθήκη των υπόλοιπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες:

Ρυθμιστικό διάλυμα 5x:	4μl
dNTPs:	2μl
χλωριούχο μαγνήσιο:	2μl
DTT:	2μl
SuperScript III:	0,5μl

- Το διάλυμα της αντίδρασης ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR):
 - 20 °C, 10 min
 - 42 °C, 45 min
 - 99 °C, 3 min
 - 18 °C, 5 min
 - Τελική θερμοκρασία 4 °C

Για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντα στον υπό μελέτη ιστό (μετάγραφα «αναφοράς»). Στην παρούσα εργασία, το μετάγραφο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το mRNA του γονιδίου GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών για το GAPDH.

Primers GAPDH

Forward: -5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3'-

Reverse: -5' GACAAGCTTCCCGTTCTCAG 3'-

Το διάλυμα της αντίδρασης (AmpliTaq Gold 360 Master Mix, Applied Biosystems) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

- cDNA	3μl
- Ρυθμιστικό διάλυμα 2x	12,5μl
- Εκκινητής F (50p/mol)	1μl
- Εκκινητής R (50p/mol)	1μl
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH ₂ O)	7,5μl

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αποδιάταξη στους 95°C για 10min
- 40 κύκλοι με τα εξής στάδια ενίσχυσης της αλληλουχίας στόχου:
 - Αποδιάταξη στους 95°C για 30sec
 - Υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία, στους 60°C για 30sec

- Επιμήκυνση στους 72°C για 1min
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 7min

Μετά το πέρας της αντίδρασης, ο έλεγχος της παρουσίας ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε, έγινε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 3%, με μάρτυρα πρότυπων μοριακών βαρών 100bp (Fermentas).

3.9 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ mRNA ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BMP-2 & HDAC4 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (real-time PCR)

Για την ποσοτικοποίηση των mRNAs των επιλεγμένων γονιδίων ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο real-time PCR που περιεγράφηκε παραπάνω, ενώ οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γονίδιο ήταν οι εξής:

Primers BMP-2

Forward: -5' CCCAGCGTGAAAAGAGAGAC 3'-

Reverse: -5' GGAAGCAGCAACGCTAGAAG 3'-

Primers HDAC4

Forward: -5' GGTTTGAGAGCAGGCAGAAC 3'-

Reverse: -5' CAGAGAATGAGGCCAAGGAG 3'-

3.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Το DNA των κυττάρων βρίσκεται στον πυρήνα, επομένως για να απομονωθεί θα πρέπει να σπάσουν τα κύτταρα και οι πυρήνες τους, ώστε να απελευθερωθεί το περιεχόμενο DNA. Ταυτόχρονα, το κύτταρο περιέχει πρωτεΐνες και μόρια RNA τα οποία επηρεάζουν αρνητικά το καθαρό αποτέλεσμα στο οποίο στοχεύουμε με την απομόνωση –αποκλειστικά- του ολικού DNA. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται τα ένζυμα Proteinase K και RNase A, τα οποία αποδομούν τις πρωτεΐνες και το RNA αντίστοιχα.

Σε επόμενο στάδιο, το DNA θα πρέπει να διαχωριστεί από τις πρωτεΐνες οι οποίες είναι συνδεδεμένες με αυτό (π.χ. ιστόνες κ.ά.) αλλά και από τυχόν άλλα κυτταρικά υπολείμματα. Κάτι τέτοιο γίνεται με τη χρήση ειδικού απορρυπαντικού (Purelink Genomic Lysis/Binding buffer) το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση αλάτων (ETDA + Tris HCl) προκειμένου να εμποδίσει τη δράση νουκλεασών, καθώς και SDS το οποίο διαλύει τα κύτταρα και ελευθερώνει τη χρωματίνη.

Η αλκοόλη που χρησιμοποιούμε για την κατακρήμνιση του DNA είναι η ισοπροπανόλη η οποία διαθέτει -OH ομάδα, που την καθιστά πολικό μόριο. Η χαρακτηριστική της ομάδα αντιδρά με την -OH ομάδα στο 3' άκρο του DNA και το πολώνει/ωθεί σε κατακρήμνιση. Κατόπιν, οι εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα (Wash buffer) πραγματοποιούνται προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως οι αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες που προέκυψαν από προηγούμενα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης του DNA.

Τέλος, χρησιμοποιείται το διάλυμα έκλουσης (Elution buffer) προκειμένου να πραγματοποιηθεί τελική έκλυση του DNA ώστε να μπορέσουμε να παραλάβουμε το καθαρό νουκλεϊκό οξύ. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο έχει, συνήθως, ελαφρώς βασικό pH 8-9 και το χαρακτηριστικό αυτό είναι σημαντικό καθώς το DNA σταθεροποιείται περισσότερο σε ελαφρώς βασικό περιβάλλον. Επομένως, η χρήση του Elution buffer μας βοηθά να το αποθηκεύσουμε για μεγάλο χρονικό διάστημα διατηρώντας τη σταθερότητα του μορίου.

3.10.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

Χρησιμοποιήθηκε το kit: *Invitrogen PureLink Genomic DNA mini kit*

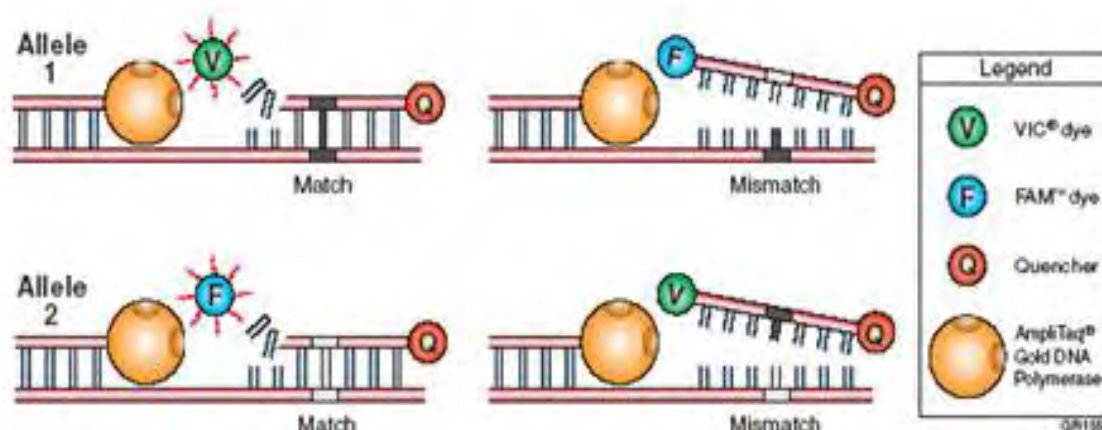
- Τοποθέτηση 200μl από το δείγμα περιφερικού αίματος σε σωληνάριο των 2ml (eppendorf)
- Προσθήκη 20μl Proteinase K
- Προσθήκη 20μl RNase A και καλή ανάδευση στο vortex
- Επώση σε θερμοκρασία δωματίου για 2min
- Προσθήκη 200μl PureLink Genomic Lysis/Binding buffer, αναδεύοντας καλά με vortex για να ομογενοποιηθεί το δείγμα
- Επώση στο υδατόλουτρο στους 55°C για 10min
- Προσθήκη 200μl ισοπροπανόλης και ανάδευση στο vortex
- Μεταφορά του περιεχομένου σε σωληνάριο συλλογής (collection tube) και φυγοκέντρηση στα 10.000rpm για 1min, σε θερμοκρασία δωματίου
- Αφαίρεση της στήλης και τοποθέτηση της σε νέο collection tube
- Προσθήκη 500μl ρυθμιστικό διάλυμα (Wash buffer 1) στη στήλη και φυγοκέντρηση στα 10.000rpm για 1min, σε θερμοκρασία δωματίου
- Μεταφορά της στήλης σε νέο collection tube και προσθήκη 500μl ρυθμιστικό διάλυμα (Wash buffer 2)
- Φυγοκέντρηση στα 13.000rpm για 3min και απομάκρυνση του collection tube
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάριο (eppendorf) και προσθήκη 200μl διαλύματος έκλουσης (Elution buffer)

- Επώαση για 1min και φυγοκέντρωση στα 13.000 rpm για 2min, σε θερμοκρασία δωματίου
- Το σωληνάριο περιέχει καθαρό DNA, ακολουθεί συλλογή και φύλαξη στους -20°C

3.11 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ (ALLELIC DISCRIMINATION Assay, AD) ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ TaqMan® Probes

Η μέθοδος διαχωρισμού των αλληλομόρφων αποτελεί μια πολλαπλή [(χρήση >1 εκκινητή/ανιχνευτή (primer/probe)] χημική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πολυμορφισμών σε μια συγκεκριμένη -κάθε φορά- νουκλεοτιδική αλληλουχία. Για το σκοπό αυτό, σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη εκκινητών, ώστε να καθίσταται δυνατή η γονοτύπηση των δύο πιθανών πολυμορφικών νουκλεοτιδίων (SNPs) στην αλληλουχία-στόχο. Για κάθε δείγμα προς γονοτύπηση χρησιμοποιούνται, επίσης, και δύο φθορίζοντες ανιχνευτές (TaqMan® TAMRA probes) οι οποίοι στοχεύουν τις θέσεις των SNPs. Το μηχανήμα που χρησιμοποιείται για την αντίδραση ανιχνεύει τη διαφορετική εκπομπή φθορισμού από τους ανιχνευτές, η οποία είναι ακριβώς αντίστοιχη με την ανίχνευση του SNP-στόχου για τον κάθε ανιχνευτή. Πιο συγκεκριμένα, ο ένας εκ των δύο ανιχνευτών είναι συμπληρωματικός για το κοινό αλληλόμορφο άγριου τύπου (allele 1), ενώ ο άλλος είναι συμπληρωματικός για το σπάνιο αλληλόμορφο (allele 2). Συνεπώς, η ταξινόμηση των δειγμάτων, κατόπιν ολοκλήρωσης της διαδικασίας της γονοτύπησης, γίνεται ως εξής:

- Ομοζυγώτης → Ανίχνευση ενός εκ των δύο αλληλομόρφων στο δείγμα
- Ετεροζυγώτης → Ανίχνευση και των δύο αλληλομόρφων στο δείγμα



Εικόνα 135: AD Assay με τη χρήση TaqMan® Probes

3.11.1 ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ AD Assay

- 2x TaqMan Universal PCR Master Mix: 7,5μl
- 20x SNP Genotyping Assay Mix: 0,75 μl
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) (DEMO S.A.): 3,75 μl

3.11.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ AD Assay ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ miR-SNP rs7205289 (C>A) ΓΙΑ ΤΟ miR-140

Για τη μέθοδο του AD Assay χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA από κάθε δείγμα, ενώ η αντίδραση είχε τελικό όγκο 15μl. Για το SNP το οποίο στοχεύθηκε χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

SNP rs7205289 (C>A) Forward -5' GCTTGGTGGGCTTCTGGT 3'-

SNP rs7205289 (C>A) Reverse -5' CCCGGTATCCTGTCCGTGGT 3'-

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Reporter C (κοινό αλληλόμορφο): -5' TAAAACCACTGTCAGGACAC 3'-

Reporter A (σπάνιο αλληλόμορφο): -5' TAAAACCACTGGCAGGACAC 3'-

- Το μίγμα που παρασκευάστηκε φορτώθηκε σε ειδικό πιάτο με 96 πηγαδάκια (96-well plate), όπου καθένα πηγαδάκι περιείχε DNA από διαφορετικό δείγμα
- Τα δείγματα ακολούθησαν, αρχικά, ένα πρόγραμμα Pre-run (60°C για 1min) κατά το οποίο καταγράφεται ο background φθορισμός για κάθε πηγαδάκι, πριν την πραγματοποίηση της αντίδρασης της PCR, προκειμένου μετά την ολοκλήρωση αυτής, να εξάγονται ακριβέστερα αποτελέσματα.
- Κατόπιν, τα δείγματα που φορτώθηκαν ακολούθησαν το παρακάτω πρόγραμμα PCR, 45 κύκλων (Amplification-run):
 - 50°C για 2min
 - 95°C για 10min
 - 95°C για 15sec
 - 60°C για 1min

3.12 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 20 και πιο συγκεκριμένα οι ακόλουθες δοκιμασίες: μη παραμετρικός έλεγχος Mann-Whitney για τη σύγκριση των τιμών μεταξύ 2 ομάδων (π.χ. σύγκριση της

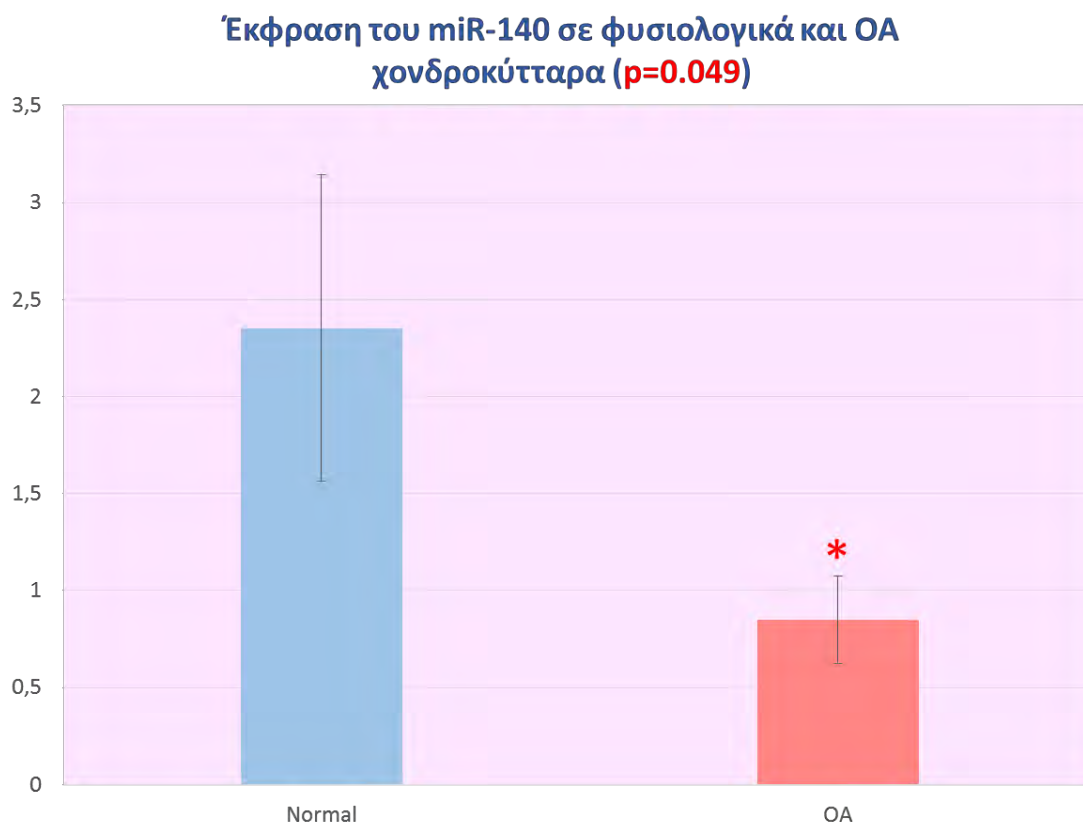
έκφρασης miR-140 σε OA και φυσιολογικό ιστό), μη παραμετρικός έλεγχος Kruskal-Wallis για τη σύγκριση των τιμών μεταξύ περισσότερων των 2 ομάδων (π.χ. σύγκριση της έκφρασης του miR-140 μεταξύ OA κυττάρων χόνδρου, μηνίσκου και υμένα), έλεγχος χ^2 για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης για το miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p\text{-value} < 0.05$, ενώ, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με την τυπική απόκλιση (mean+standard deviation, SD)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ miR-140 ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΟΑ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΡΘΡΙΚΟΥ ΥΜΕΝΑ ΚΑΙ ΜΗΝΙΣΚΟΥ

Το miR-140 εμπλέκεται στις αναπτυξιακές διεργασίες του μυοσκελετικού συστήματος, όπως η χονδρογένεση και η ενδοχόνδρια οστεοποίηση, μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης μορίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της ωρίμανσης των χονδροκυττάρων και της διαφοροποίησης τους σε υπερτροφικά. Επιπλέον, όπως έχει δειχθεί σε σχετικές μελέτες, το miR-140 ενέχεται στην αιτιο-παθογένεια της ΟΑ, γεγονός που το καθιστά πιθανό θεραπευτικό στόχο.

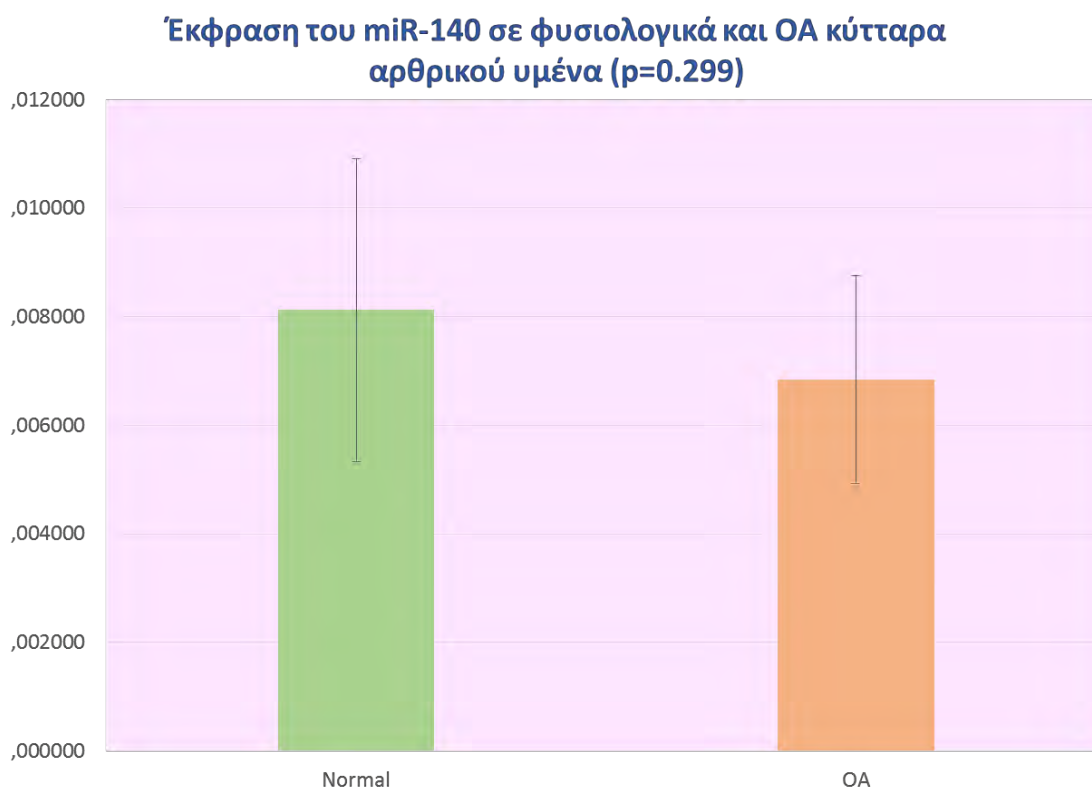
Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-140 σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων, και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν έδειξαν τη στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) μείωση των επιπέδων του στα ΟΑ χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα φυσιολογικά.



Εικόνα 16: Έκφραση του miR-140 σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα (ο αστερίσκος δηλώνει στατιστική σημαντικότητα)

Κατόπιν, το ίδιο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε και σε καλλιέργειες κυττάρων αρθρικού υμένα. Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης του miR-140 σε OA και σε φυσιολογικά κύτταρα αρθρικού υμένα (Εικόνα 17).

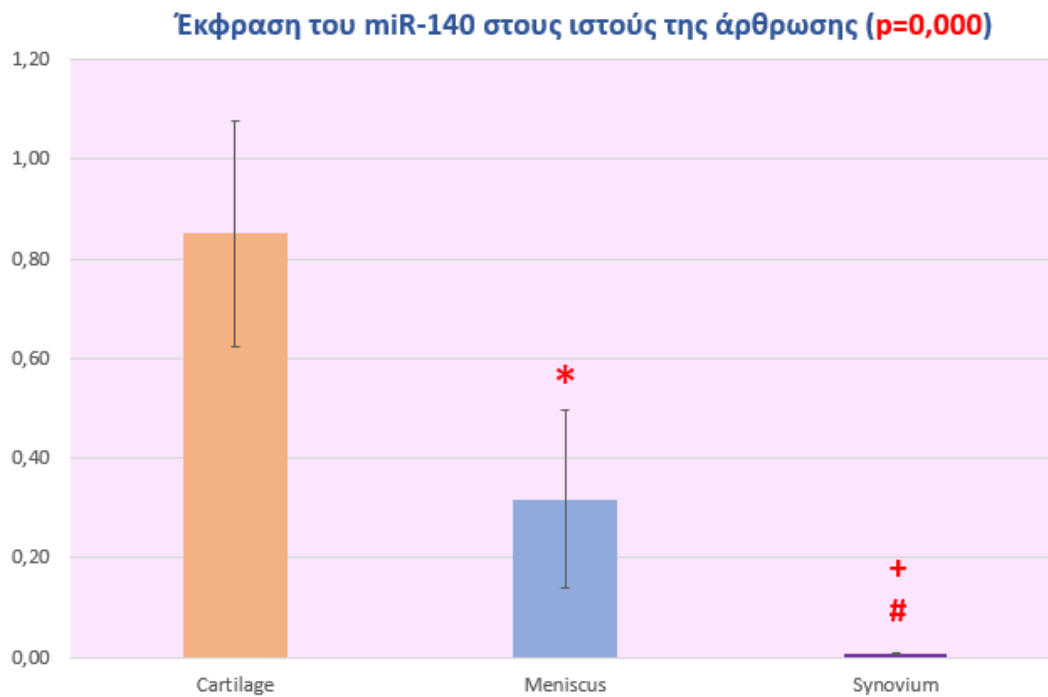
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του miR-140 σε OA χονδροκύτταρα με την αντίστοιχη έκφραση σε OA κύτταρα μηνίσκου και αρθρικού υμένα. Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, φαίνεται πως υπάρχει αυξημένη έκφραση του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα του μηνίσκου, όπως επίσης και αυξημένη έκφραση του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα του αρθρικού υμένα. Ακόμα, φαίνεται πως υπάρχει αυξημένη έκφραση του miR-140 στα κύτταρα του μηνίσκου σε σχέση με τα κύτταρα του υμένα (Εικόνα 18).



Εικόνα 17: Έκφραση του miR-140 σε φυσιολογικά και OA κύτταρα αρθρικού υμένα

4.2 ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ BMP-2 ΚΑΙ HDAC4 ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ miR-140 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ OA ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα γονίδια-στόχοι για το miR-140 επιλέχθηκαν με τη βοήθεια των εργαλείων βιοπληροφορικής, κατόπιν αναζήτησης σε αντίστοιχες βάσεις δεδομένων. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: miRWalk, miRanda, RNA22, Targetscan.



Εικόνα 18: Έκφραση του miR-140 στους ιστούς της άρθρωσης

(*: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ χονδροκυττάρων και κυττάρων μηνίσκου

#: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ χονδροκυττάρων και κυττάρων αρθρικού υμένα

+: στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ κυττάρων μηνίσκου και αρθρικού υμένα)

Καθεμία από τις προαναφερθείσες βάσεις δεδομένων έδωσε ένα διαφορετικό αριθμό γονιδίων-στόχων για το miR-140:

- miRWalk → 7681 γονίδια-στόχοι
- miRanda → 5628 γονίδια-στόχοι
- RNA22 → 3502 γονίδια-στόχοι
- Targetscan → 6718 γονίδια-στόχοι

Για το σύνολο των γονιδίων που εμφανίστηκαν ως γονίδια-στόχοι του miR-140 και στις τέσσερις αυτές βάσεις δεδομένων (676 γονίδια), ελέγχθηκε με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος Panther η εμπλοκή τους σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες και κατόπιν, επιλέχθηκαν δύο γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην αναπτυξιακή διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης: η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP-2) και η απο-ακετυλάση των ιστονών 4 (HDAC4) (Εικόνες 19α, 19β).

Με τη βοήθεια ειδικού υπολογιστικού προγράμματος, βρέθηκε ότι το miR-140 προσδένεται στην 3'-UTR των BMP-2 και HDAC4, με πλήρη συμπληρωματικότητα.

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 323-329 of BMP2 3' UTR	5' ...UUUUAUUUACUUAUUUAUAAACCACUU...
hsa-miR-140-5p	3' GAUGGUAUCCCAUUUUUGGUGAC

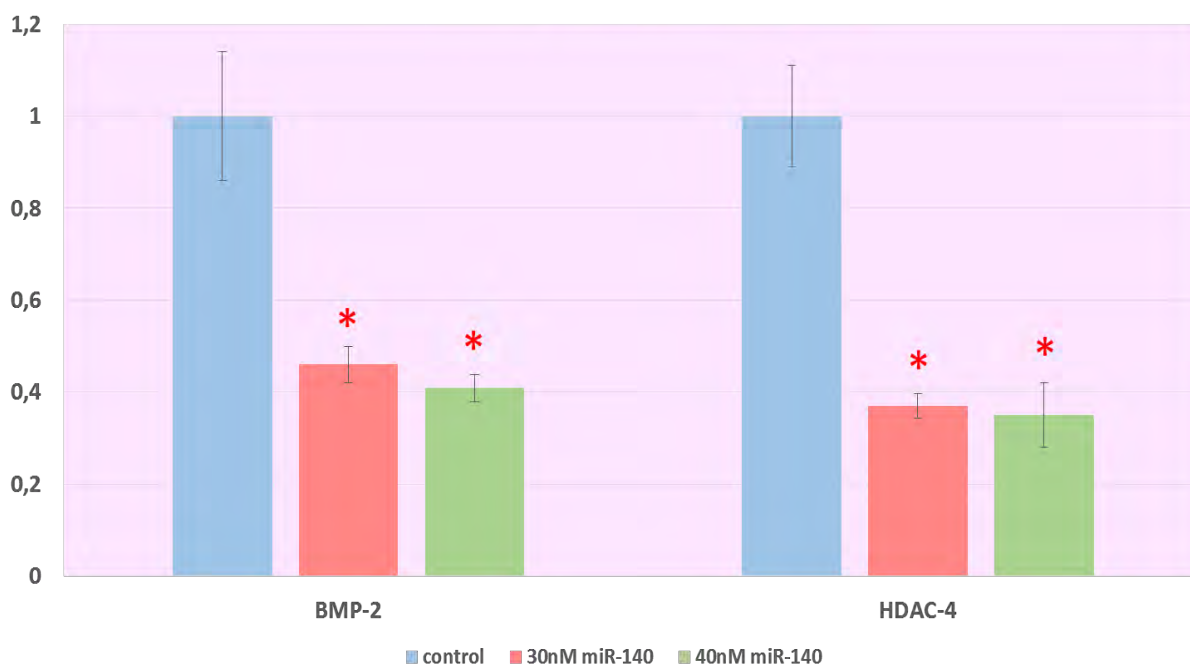
Εικόνα 19α: Αλληλουχία αναγνώρισης του miR-140 στην 3'UTR του mRNA της BMP-2

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)
Position 453-459 of HDAC4 3' UTR	5' ...CACAGUCUCUGUGUAAACCACUC...
hsa-miR-140-5p	3' GAUGGUAUCCCAUUUUUGGUGAC

Εικόνα 19β: Αλληλουχία αναγνώρισης του miR-140 στην 3' UTR του mRNA της HDAC4

Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της έκφρασης των γονιδίων BMP-2 και HDAC4, έπειτα από επιδράσεις με το miR-140 σε κυτταροκαλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p=0,05$) μείωση της έκφρασης και των δύο γονιδίων στις επιμολυσμένες με miR-140 (σε συγκέντρωση 30nM και 40nM) κυτταρικές σειρές έπειτα από 24h και 48h, σε σύγκριση με τις μη επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές ελέγχου (Εικόνα 20).

Έκφραση των γονιδίων BMP-2 και HDAC4 έπειτα από επιδράσεις με miR-140 σε ΟΑ χονδροκύτταρα ($p=0,05$)

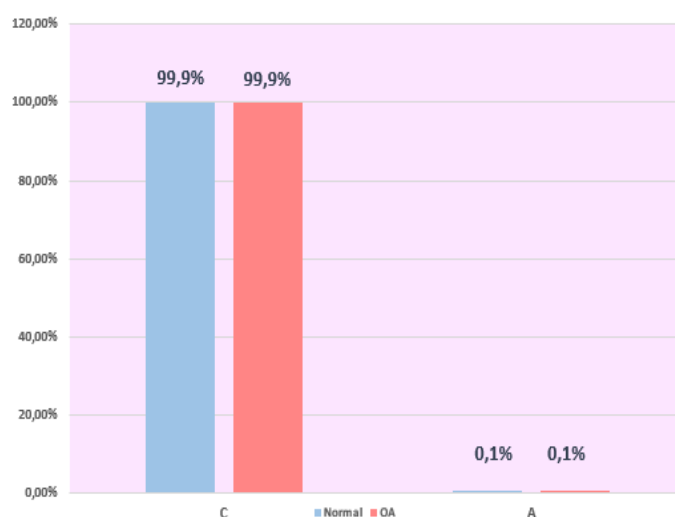


Εικόνα 20: Έκφραση των γονιδίων BMP-2 και HDAC4 έπειτα από επιδράσεις με miR-140 σε κυτταροκαλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων (ο αστερίσκος δηλώνει στατιστική σημαντικότητα)

4.3 ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ miR-SNP rs7205289 (C>A) ΤΟΥ miR-140

Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης των φυσιολογικών και ΟΑ δειγμάτων για το miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ύπαρξης του σπάνιου αλληλίου Α με την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου ($p>0,05$). (Εικόνα 21)

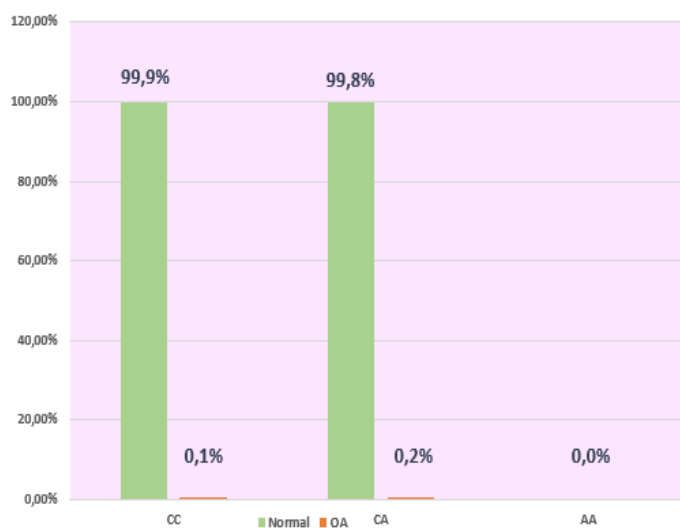
Γονοτύπηση του miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140 σε ΟΑ και φυσιολογικά δείγματα



Εικόνα 21: Έλεγχος αλληλίων

Οι συμμετέχοντες που έφεραν το αλληλίο Α ήταν ετεροζυγώτες για το συγκεκριμένο πολυμορφισμό (1 άτομο από την ομάδα ελέγχου, 2 άτομα με ΟΑ), με γονότυπο CA, ενώ δεν παρατηρήθηκαν ομοζυγώτες με γονότυπο AA. Από τον αντίστοιχο έλεγχο χ^2 για τους γονοτύπους, επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του σπάνιου ετερόζυγου γονοτύπου CA με την εκδήλωση ΟΑ φαινοτύπου ($p>0,05$). (Εικόνα 22)

Γονοτύπηση του miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140 σε ΟΑ και φυσιολογικά δείγματα



Εικόνα 22: Έλεγχος γονοτύπων

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια από τις πιο κοινές αρθροπάθειες του μυοσκελετικού συστήματος, με υψηλά ποσοστά επιπολασμού στις αναπτυγμένες χώρες παγκοσμίως (Zhang Y. et al., 2010). Για το λόγο αυτό, έχει χαρακτηριστεί ως μείζον πρόβλημα υγείας από τους αρμόδιους φορείς, ενώ συνεπιφέρει ένα σοβαρό κοινωνικο-οικονομικό αντίκτυπο τόσο για τα εθνικά συστήματα υγείας, όσο και για την ποιότητα ζωής των ασθενών. Κι αυτό, καθώς η ΟΑ ευθύνεται για την εμφάνιση οξύτατου πόνου και σοβαρών προβλημάτων κινητικότητας/αναπηρίας για τους πάσχοντες, γεγονός που περιορίζει τις καθημερινές δραστηριότητες και υποβαθμίζει σταδιακά την ποιότητα ζωής τους (Goldring MB and Goldring SR, 2007).

Δεδομένης της πολυπαραγοντικής αιτιολογίας του εν λόγω νοσήματος, δεν έχει καταστεί μέχρι σήμερα δυνατός ο πλήρης χαρακτηρισμός των παραγόντων που εμπλέκονται στην εκδήλωση της παθογένειας της ΟΑ. Ωστόσο, κάποια χαρακτηριστικά όπως το φύλο, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος (παχυσαρκία) και οι τραυματισμοί των αρθρώσεων έχουν χαρακτηριστεί, ως ένα βαθμό, προδιαθεσικοί παράγοντες της εμφάνισης της νόσου (Arden N. and Nevitt M., 2006). Επίσης, οι γενετικοί παράγοντες εμπλέκονται στην παθογένεια της ΟΑ, καθώς η κληρονομικότητα έχει βρεθεί πως αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% της προδιάθεσης έναντι της νόσου, ενώ μελέτες GWAS έχουν αποκαλύψει ένα σύνολο γενετικών τόπων να σχετίζονται με τη νόσο (Zengini E. et al, 2016).

Εκτός της γενετικής και οι επιγενετικοί μηχανισμοί φαίνεται να συμβάλλουν στην έναρξη και εξέλιξη της ΟΑ. Ως κομμάτι της επιγενετικής ρύθμισης έχει χαρακτηριστεί και η δράση των miRNAs. Έτσι, η μελέτη του ρυθμιστικού ρόλου τους έχει αποτελέσει αντικείμενο έρευνας και στα πλαίσια της διερεύνησης της πολυπαραγοντικής αιτιο-παθογένειας της ΟΑ, αφού σύγχρονες μελέτες της τελευταίας δεκαετίας αποκαλύπτουν τη συμμετοχή των miRNAs στη ρύθμιση της διαδικασίας της ανάπτυξης του μυοσκελετικού συστήματος, της χονδρογένεσης, της ενδοχόνδριας οστεοποίησης και της διατήρησης της ομοιόστασης του αρθρικού χόνδρου (Miyaki S. and Asahara, H., 2012). Πολλά από τα miRNAs που εμπλέκονται στις διαδικασίες της φυσιολογικής ανάπτυξης του χόνδρου, παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην ΟΑ, συμβάλλοντας την αιτιο-παθογένεια της. Ειδικότερα, το miR-140 αποτελεί το καλύτερα μελετημένο miRNA που εκφράζεται ιστο-ειδικά στον αρθρικό χόνδρο, κατέχοντας ρυθμιστικό ρόλο στη διαδικασία της διαφοροποίησης και ωρίμανσης των χονδροκυττάρων, καθώς και της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Επίσης, ένας μεγάλος αριθμός σύγχρονων ερευνών έχει αποκαλύψει την εμπλοκή αυτού στην παθογένεια της νόσου, καθώς παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση στην ΟΑ ενώ συμμετέχει στη

ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που διαταράσσουν την ομοιοστασία των χονδροκυττάρων (π.χ. MMP-13, ADAMTS-5) (Iliopoulos D. et al., 2008).

Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας αποτέλεσε, αρχικά, ο προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του miR-140 σε διάφορους κυτταρικούς τύπους της άρθρωσης. Πιο συγκεκριμένα, για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν χονδροκύτταρα από φυσιολογικό και OA ιστό, κύτταρα αρθρικού υμένα από φυσιολογικό και OA ιστό και κύτταρα μηνίσκου από OA ιστό. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του miR-140 στους προαναφερθέντες ιστούς με τη χρήση του πρωτοκόλλου της real-time PCR, έδειξαν ότι το miR-140 εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα στα χονδροκύτταρα σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης του στα κύτταρα αρθρικού υμένα και μηνίσκου, γεγονός που επιβεβαιώνει την ιστο-ειδική έκφραση του miR-140 στον αρθρικό χόνδρο (Araldi E. and Schipani E., 2010). Επιπλέον, όπως προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του miR-140 στα κύτταρα του μηνίσκου, σε σχέση με τα επίπεδα αυτού στα κύτταρα του αρθρικού υμένα. Το εύρημα αυτό, θα μπορούσε, πιθανότατα, να οφείλεται, εν μέρει, στο γεγονός ότι ανάμεσα στους κυτταρικούς τύπους που συγκροτούν τον ιστό του μηνίσκου των αρθρώσεων, συμπεριλαμβάνονται και κύτταρα που ομοιάζουν φαινοτυπικά με τα χονδροκύτταρα (Makris E., et al., 2011). Τέλος, στα κύτταρα αρθρικού υμένα παρουσιάστηκαν τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-140, γεγονός που, ενδεχομένως, να αποτελεί ένδειξη του ότι το συγκεκριμένο miRNA εκφράζεται σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα, ή σχεδόν καθόλου, στον συγκεκριμένο αρθρικό ιστό. Κάτι τέτοιο, θα μπορούσε, ωστόσο, να οφείλεται και στον μικρό αριθμό δειγμάτων που εξετάστηκαν. Ενδεχομένως, η επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων να έδινε αποτελέσματα με μεγαλύτερη ισχύ και στατιστική σημαντικότητα.

Όσον αφορά τη σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του miR-140 σε φυσιολογικούς και OA ιστούς της άρθρωσης, τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης του miR-140 στα OA χονδροκύτταρα, σε σχέση με τα χονδροκύτταρα φυσιολογικού ιστού, προτείνοντας τη συμμετοχή του miR-140 στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δε φαίνεται να ισχύει και για τον αρθρικό υμένα, καθώς δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της έκφρασης του miR-140 σε OA και φυσιολογικά κύτταρα του συγκεκριμένου αρθρικού ιστού. Τα αποτελέσματα μας έρχονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Iliopoulos και συνεργατών το έτος 2008, που έδειξε διαφοροποιημένη έκφραση του miR-140 μεταξύ φυσιολογικών και OA χονδροκυττάρων (Iliopoulos D. et al., 2008) και επιβεβαιώθηκε, αργότερα, και από άλλες δύο μελέτες των Miyaki και συνεργατών (Miyaki S. et al., 2009) και Tardif και συνεργατών (Tardif G. et al., 2009). Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσαμε να πούμε ότι στην περίπτωση εκδήλωσης της

OA, το miR-140 εμφανίζει μειωμένη έκφραση στα χονδροκύτταρα επηρεάζοντας, κατ' επέκταση, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-στόχων αυτού. Πιο συγκεκριμένα, για τα γονίδια-στόχους για τα οποία -υπό φυσιολογικές συνθήκες- αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή, σε περίπτωση OA η μειωμένη έκφραση του miR-140 θα προκαλούσε υπερέκφραση των γονιδίων αυτών. Κάτι τέτοιο συμβαίνει, για παράδειγμα, με τα καταβολικά μόρια της ECM (MMPs, ADAMTSs) -που αποτελούν γονίδια-στόχους για το miR-140- οδηγώντας σε εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου λόγω της υπερέκφρασης -άρα και υπερβολικής καταβολικής δράσης- των συγκεκριμένων μορίων, φαινόμενο που αποτελεί χαρακτηριστικό παθολογικό εύρημα στον OA χόνδρινο ιστό (Zhang R. et al., 2013). Το προαναφερθέν, έχει επιβεβαιωθεί και από πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια, όπου η υπερέκφραση του miR-140 συνοδευόταν από εκδήλωση μιας μορφής ανθεκτικότητας στην εκδήλωση OA, λόγω καταστολής της έκφρασης καταβολικών ενζύμων της ECM (Miyaki S. et al., 2010). Από τα παραπάνω, αποδεικνύεται η διπλή δράση του miR-140 στα χονδροκύτταρα, καθώς, όπως αναλύσαμε, το miR-140 αποτελεί απαραίτητο ρυθμιστικό μόριο κατά τη χονδρογένεση και την ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου. Ωστόσο, το συγκεκριμένο μόριο φαίνεται να συμμετέχει και σε διεργασίες εκφυλισμού της χόνδρινης επιφάνειας των οστών, λόγω απορρύθμισης και διαταραχής των επιπέδων έκφρασης αυτού, και κατ' επέκταση των γονιδίων-στόχων του που συμμετέχουν στις διαδικασίες διατήρησης της ομοιόστασης των χονδροκυττάρων. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η πλήρης κατανόηση του συνόλου των μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-140, όπως επίσης και η ανακάλυψη του συνόλου των γονιδίων που αποτελούν ρυθμιστικό στόχο για το συγκεκριμένο miRNA, προκειμένου να καταστεί δυνατός ο καλύτερος χαρακτηρισμός της μοριακής βάσης της OA και η ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση του εν λόγω πολυπαραγοντικού νοσήματος.

Στα πλαίσια μιας προσπάθειας κατανόησης των μοριακών μηχανισμών που συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του miR-140 -και δεδομένου ότι η σχετική δημοσιευμένη γνώση είναι αρκετά περιορισμένη μιας και δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές λειτουργικές μελέτες που να αναδεικνύουν τον τρόπο ρύθμισης του εν λόγω miRNA- στην παρούσα εργασία στραφήκαμε στη διερεύνηση του ρόλου των μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) των miRNAs, ακολουθώντας μια κατεύθυνση που υιοθετείται ευρέως από τη σύγχρονη ερευνητική κοινότητα (Dole NS. and Delany AM., 2015). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι, σύμφωνα με σύγχρονες αναφορές, τα SNPs πιθανότατα εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης και της λειτουργίας των miRNAs, όπως επίσης και το γεγονός ότι τα miR-SNPs επεμβαίνουν στις διεργασίες της βιογένεσης και της ωρίμανσης των miRNAs οδηγώντας σε μείωση είτε αύξηση των μεταγράφων των miRNAs (Duan R. et al., 2007), επιλέξαμε να μελετήσουμε την πιθανή εμπλοκή του μονονουκλεοτιδικού

πολυμορφισμού miR-SNP rs7205289 (C>A) στη ρύθμιση του miR-140 και, συνεπώς, στην παθογένεση της OA. Το συγκεκριμένο miR-SNP εντοπίζεται εντός της αλληλουχίας του γονιδίου Wwp2 -από το οποίο προκύπτει το miR-140- και συγκεκριμένα αποτελεί τμήμα της αλληλουχίας του pre-miR-140, επηρεάζοντας, έτσι, τη διαδικασία της ωρίμανσης του miR-140 (Li L. et al., 2010). Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση OA και φυσιολογικών δειγμάτων DNA, και τα ευρήματα από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συχνότητα εμφάνισης του σπάνιου γονοτύπου CA στους ασθενείς με OA, επομένως, η ύπαρξη του πολυμορφισμού miR-SNP rs7205289 (C>A) του miR-140 πιθανότατα δεν αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα που σχετίζεται με την εκδήλωση OA φαινοτύπου από τα άτομα που φέρουν το σπάνιο αλληλίο A έναντι του κοινού αλληλίου C. Ενδεχομένως, λοιπόν, η ρύθμιση της έκφρασης του miR-140 να έγκειται σε άλλους τροποποιητικούς μοριακούς μηχανισμούς ή ακόμα και στην ύπαρξη διαφορετικών SNPs για το συγκεκριμένο miRNA. Επομένως, η ανίχνευση ενός διαφορετικού miR-SNP που να αφορά το miR-140 και κατόπιν η γονοτύπηση αυτού σε OA και φυσιολογικά δείγματα, να καταδείκνυε τη συμμετοχή του στη ρύθμιση της δράσης του εν λόγω miRNA και να έδειχνε κάποια συσχέτιση με την εκδήλωση της OA. Για το λόγο αυτό, κρίνεται απαραίτητη η επέκταση της παρούσας μελέτης προς τη διερεύνηση του ρόλου περαιτέρω ρυθμιστικών διεργασιών της έκφρασης και της δράσης του miR-140.

Δεδομένου ότι έχουν διατυπωθεί σοβαρές ενδείξεις ότι το miR-140 αποτελεί ένα ρυθμιστικό μόριο με εμπλοκή στην παθογένεση της OA, τόσο λόγω του ότι παρουσιάζει ιστο-ειδική έκφραση στον αρθρικό χόνδρο, αλλά κι επειδή εμπλέκεται στις διαδικασίες της χονδρογένεσης και της ενδοχόνδριας οστεοποίησης στοχεύοντας τα γονίδια που συμμετέχουν στις διεργασίες αυτές, επόμενο στόχο της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η αναζήτηση των γονιδίων-στόχων του miR-140, με τη βοήθεια εργαλείων βιοπληροφορικής. Από την αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων miRWalk, miRanda, RNA22 και Targetscan, 676 γονίδια-στόχοι του miR-140 που εμφανίστηκαν και στις τέσσερις, βρέθηκαν -μέσω του προγράμματος βιοπληροφορικής Panther- να συμμετέχουν σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών. Ωστόσο, η χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων και δεδομένων που προκύπτουν από αντίστοιχες βάσεις περιορίζεται στη παροχή πληροφοριών σχετικά με την αντιστοιχία του εκάστοτε miRNA με τα διάφορα mRNAs-στόχους, χωρίς να προχωρά σε κυτταρικό επίπεδο. Πιο συγκεκριμένα, η βιοπληροφορική ανάλυση των miRNAs και των αλληλουχιών-στόχων τους, αδυνατεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα ακριβή επίπεδα έκφρασης των miRNAs και των μοριακών μονοπατιών μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν προκειμένου να επέμβουν στη γονιδιακή έκφραση των στόχων τους, στους διάφορους κυτταρικούς τύπους.

Προκειμένου, λοιπόν, να διερευνηθεί ο τρόπος που επιτυγχάνεται η ρύθμιση της - διαμεσολαβούμενης από το miR-140- γονιδιακής έκφρασης, επόμενο στόχο αποτέλεσε η πειραματική μελέτη της αλληλεπίδρασης του συγκεκριμένου μορίου με επιλεγμένα γονίδια-στόχους, έπειτα από επιμόλυνση κυτταροκαλλιέργειών OA χονδροκυττάρων με miR-140 και, κατόπιν, ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων αυτών. Συγκεκριμένα, για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν -κατόπιν της αναζήτησης σε κατάλληλες βάσεις δεδομένων- δύο γονίδια-στόχοι του miR-140 που συμμετέχουν στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών (BMP-2) (Capdevila J. and Johnson RL., 1998) και η απο-ακετυλάση των ιστονών 4 (HDAC4) (Lu J. et al., 2014). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι, έπειτα από τη χορήγηση του miR-140 στις καλλιέργειες των OA χονδροκυττάρων, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης τόσο της BMP-2 όσο και της HDAC4, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης στα μη επιμολυσμένα OA χονδροκύτταρα. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα, αφενός αποδεικνύουν ότι το miR-140 όντως στοχεύει τα δύο γονίδια, υποστηρίζοντας ότι το εν λόγω miRNA εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των BMP-2 και HDAC4, αφετέρου αναδεικνύει κι ένα πιθανό μοριακό μηχανισμό που επεξηγεί, εν μέρει, τη διαφοροποιημένη έκφραση των δύο γονιδίων στον OA χόνδρο. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με πληροφορίες που συλλέγουμε από τη σχετική υπάρχουσα βιβλιογραφία, το miR-140 αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή τόσο για το BMP-2 (Nakamura Y. et al., 2011) όσο και για το HDAC4 (Tuddenham L. et al., 2006). Το γεγονός αυτό συνεπάγεται πως η μειωμένη έκφραση που υφίσταται το miR-140 κατά την OA οδηγεί σε ανεπαρκή στόχευση των BMP-2 και HDAC4. Αντίστοιχα, σε περίπτωση ενίσχυσης της έκφρασης του miR-140 -όπως πραγματοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη- τα BMP-2 και HDAC4 υπόκεινται σε περαιτέρω αρνητική ρύθμιση που οδηγεί σε μειωμένη έκφραση αυτών, καθώς η σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών και του miR-140 είναι αντιστρόφως ανάλογη.

Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι τόσο το miR-140 όσο και τα επιλεγμένα γονίδια-στόχοι του (BMP-2, HDAC4) δεν εμπλέκονται αποκλειστικά στη διαδικασία της ενδοχόνδριας οστεοποίησης -παρά το γεγονός ότι επιλέχθηκαν για τη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη με βάση αυτό το κριτήριο- καθώς δε συμμετέχουν αποκλειστικά σε ένα μονοπάτι, ούτε αποτελούν στόχο αποκλειστικά του miR-140. Σε πρόσφατη μελέτη των Papaioannou και συνεργατών (Papaioannou G. et al., 2015) αποδείχθηκε πως το miR-140 δεν στοχεύει την HDAC4 μόνο όσον αφορά το μονοπάτι Runx2/Smad3 (Tuddenham L. et al., 2006), αλλά και μέσω του μονοπατιού PTHrP/HDAC4, στο οποίο συμμετέχει και το σχετιζόμενο με την παραθυροειδή ορμόνη πεπτίδιο PTHrP. Πιο συγκεκριμένα, το PTHrP έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη διαδικασία της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων σε υπερτροφικά, ενισχύοντας τη δράση της HDAC4, ενώ στο συγκεκριμένο μονοπάτι το miR-

140 λειτουργεί σαν αναστολέας της HDAC4. Επιπροσθέτως, υπάρχουν πρόσφατες δημοσιευμένες μελέτες όπου γίνεται λόγος για αλληλεπίδραση της HDAC4 με miRNAs διαφορετικά του miR-140 (Chen W. et al., 2016), (Yiang X. et al., 2016) και για συμμετοχή της σε -σχετιζόμενα με την OA- μονοπάτια της φλεγμονής (Yiang X. et al., 2016), (Lu J. et al., 2014). Επιπλέον, όσον αφορά το ρόλο της BMP-2 στην εκδήλωση της OA, φαίνεται πως η έκφραση της έχει συσχετιστεί και με το μεταβολικό φαινότυπο της OA, καθώς έπειτα από επίδραση με λεπτίνη σε χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της BMP-2 αποσκοπώντας στην επαγωγή μορίων COL2A1, με την παράλληλη συμμετοχή των HDAC3 και HDAC4 μέσω διαφορετικών μονοπατιών για την κάθε από-ακετυλάση (Chang SF. et al., 2015).

Δεδομένου ότι το βασικότερο σκοπό της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του ρόλου του miR-140 στην OA γενικότερα, θα ήταν παράλειψη να επιμείνουμε αποκλειστικά στη διερεύνηση της ρυθμιστικής του δράσης κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση. Αντιθέτως, θα μπορούσαμε να επεκτείνουμε το συλλογισμό ότι το miR-140 αποτελεί ρυθμιστικό μόριο για πληθώρα γονιδίων (Nicolas FE. et al., 2008) και για περαιτέρω διεργασίες -σχετικές με την εκδήλωση της OA- στις οποίες συμμετέχουν τα εν λόγω γονίδια. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα θα μπορούσε να αποτελεί η αλληλεπίδραση του miR-140 με μόρια ιντερλευκινών, υποδεικνύοντας την εμπλοκή του συγκεκριμένου miRNA σε μονοπάτια της φλεγμονής που συνδέονται με την εκδήλωση OA. Αντίστοιχες περιπτώσεις μελετών που έχουν διεξαχθεί αποτελούν η μελέτη των Miyaki και συνεργατών (Miyaki S. et al., 2009) και των Liang ZJ. και συνεργατών (Liang ZJ et al., 2012), οι οποίοι με τη βοήθεια της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών απέδειξαν -αντίστοιχα- ότι το miR-140 δύναται να αλληλεπιδρά με την IL-1β οδηγώντας σε διαταραχή-τροποποίηση του προτύπου έκφρασης των σχετιζόμενων με την OA γονιδίων-στόχων του, όπως επίσης ότι το miR-140 σε αλληλεπίδραση με την MMP-13 υπόκειται σε αρνητική ρύθμιση από την IL-1β με τη παράλληλη συμμετοχή και του NF-κβ. Επιπλέον, από τη μελέτη των Liang Y. και συνεργατών (Liang Y. et al., 2016) προκύπτει ότι το miR-140 συμμετέχει σε κοινό μονοπάτι με τον υποδοχέα των οιστρογόνων ER και την 17-β-οιστραδιόλη E2 (η οποία, όπως και το miR-140, καταστέλλει την MMP-13), με τελικό στόχο την καταστολή του επαγόμενου από την IL-1β εκφυλισμού της ECM. Επιπροσθέτως, σε μελέτη των Genemaras και συνεργατών (Genemaras A.A. et al., 2015) περιεγράφηκε ότι έπειτα από τραυματισμό του αρθρικού χόνδρου και χορήγηση της πρωτεΐνης-ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-1 IRAP, παρουσιάστηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του miR-140 (μεταξύ άλλων miRNAs), οδηγώντας, τελικά, σε αναστολή της δράσης καταβολικών ενζύμων της ECM. Σε πρόσφατη μελέτη των Li και συνεργατών (Li X. et al., 2016) διατυπώθηκε το γεγονός ότι το miR-140 δύναται να δρα σε συνεργία με άλλα miRNAs (εδώ γίνεται λόγος για το miR-29a),

παρουσιάζοντας προστατευτική δράση έναντι της αρνητικής επίδρασης της IL-1β στη διεργασία του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων, μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης γονιδίων όπως τα COL2A1, COL10A1, ADAMTS4, ADAMTS5, κ.ά..

Εν τέλει, συνάγεται το συμπέρασμα ότι το miR-140 κατέχει ένα αρκετά πολύπλοκο ρόλο όσον αφορά την παθογένεια της ΟΑ. Τόσο η ιστο-ειδικότητα που παρουσιάζει στην έκφρασή του, όσο και η συμμετοχή του σε αναπτυξιακές διεργασίες που αφορούν κατά κύριο λόγο τα χονδροκύτταρα (χονδρογένεση, ενδοχόνδρια οστεοποίηση), καθιστούν το εν λόγω miRNA ένα πιθανό μόριο στόχευσης για πειραματικές μελέτες, με σκοπό την ανάδειξη των μοριακών μονοπατιών όπου εμπλέκεται μέσω της ρύθμισης που επιφέρει στην έκφραση των γονιδίων-στόχων του, την ανακάλυψη όλων των miRNAs που δρουν σε συνεργία με το miR-140 σε αντίστοιχα μονοπάτια, αλλά και τον πλήρη χαρακτηρισμό των τροποποιητικών μοριακών μηχανισμών που ενέχονται στη ρύθμιση της έκφρασης και της δράσης του. Επεκτείνοντας, λοιπόν, τους στόχους που τέθηκαν στα πλαίσια ολοκλήρωσης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, η προσπάθεια ανάδειξης της πιθανής συμμετοχής του miR-140 σε διεργασίες που σχετίζονται με την ΟΑ -πέραν εκείνων που αφορούν τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων- θα μπορούσε να αποτελεί ένα μελλοντικό ερευνητικό στόχο. Επί παραδείγματι, με βάση τις ενδείξεις που προκύπτουν από την υπάρχουσα βιβλιογραφία για την εμπλοκή του miR-140 σε μοριακά μονοπάτια σχετιζόμενα με τη φλεγμονή, θα μπορούσε να διερευνηθεί εκτενέστερα, ενδεχομένως, ο ρόλος του συγκεκριμένου μορίου σε ανάλογα μονοπάτια, όπως επίσης και ο χαρακτηρισμός γονιδίων-στόχων με τα οποία, πιθανόν, να αλληλοεπιδρά. Επιπλέον, ενδιαφέρον θα παρουσίαζε και η προσπάθεια πιθανού συσχετισμού μοριακών μονοπατιών του miR-140 που ενέχονται σε διαφορετικές διεργασίες (π.χ. διαφοροποίηση χονδροκυττάρων, φλεγμονή), μέσω της ανάδειξης της συνεργιστικής του δράσης με άλλα miRNAs και της αλληλεπίδρασης με γονίδια-στόχους του που είναι κοινά για τις διεργασίες αυτές (π.χ. όπως προαναφέρθηκε, η HDAC4 αποτελεί στόχο του miR-140 στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση, συμμετέχει ωστόσο και σε μονοπάτια της φλεγμονής). Κάτι τέτοιο, πέραν του ότι θα διαφώτιζε το ελλιπώς χαρακτηρισμένο κομμάτι του ρόλου του miR-140 στην παθογένεια της ΟΑ, θα αποκάλυπτε την κλινική σημασία της ενδεχόμενης, μελλοντικής, θεραπευτικής στόχευσης/αναστολής του ίδιου ή μορίων-στόχων του, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί με απώτερο στόχο την αποκατάσταση διαταραγμένων -λόγω ΟΑ- μοριακών μονοπατιών σε πολλές, παράλληλες, ξεχωριστές διεργασίες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arden N. and Nevitt M., 2006, Osteoarthritis: Epidemiology, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 20(1), 3–25
- Zhang Y. et al., 2010, Epidemiology of Osteoarthritis, Clin Geriatr Med., 26(3): 355–369
- Grazio S. et al, 2009, [Obesity: risk factor and predictor of osteoarthritis], Lijecnicki Vjesnik, 131(1-2):22-6
- Loeser R. et al., 2012, Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ, ARTHRITIS & RHEUMATISM, 64(6), 1697–1707
- Goldring MB and Goldring SR, 2007, Osteoarthritis, J. Cell. Physiol. 213, 626–634
- Trzeciak T. and Czarny-Ratajczak M., 2014, MicroRNAs: Important Epigenetic Regulators in Osteoarthritis, Current Genomics, 15, 481-484
- Auw Yang K.G. et al., 2004, Osteoarthritis of the knee: current treatment options and future directions, Current Orthopaedics, 18, 311–320
- Johnson VL. et al., 2014, The epidemiology of osteoarthritis, Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 28, 5–15
- Dieppe P. and Lohmander LS., 2005, Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis, Lancet, 365, 965–73
- Litwic A. et al., 2013, Epidemiology and Burden of Osteoarthritis, Br Med Bull., 105, 185–199
- Suri P. et al., 2012, Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities, American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation Journal, 4, 10-19
- Lawrence RC et al., 1998, Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States, Part II, Arthritis Rheum., 58(1), 26–35
- Reyes Llerena GA. et al., 2000, Prevalence of musculoskeletal complaints and disability in Cuba. A community-based study using the COPCORD core questionnaire, Clinical and Experimental Rheumatology, 18, 739-742
- Senna ER et al., 2004, Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach, The Journal of Rheumatology, 31:3, 594-597
- Arthritis Research UK, Osteoarthritis in General Practice, 2013

Haq SA. et al., 2005, Prevalence of rheumatic diseases and associated outcomes in rural and urban communities in Bangladesh: a COPCORD study, *The Journal of rheumatology*, 32(2), 348-353

Zeng QY. et al., 2008, Rheumatic Diseases in China, *Arthritis Research & Therapy*, 10(1):R17

Fransen M. et al., 2011, The epidemiology of osteoarthritis in Asia, *International Journal of Rheumatic Diseases*, 14, 113–121

Andrianakos AA. et al., 2006, Prevalence of Symptomatic Knee, Hand, and Hip Osteoarthritis in Greece. The ESORDIG Study, *The Journal of Rheumatology*, 33(12), 2507-2513

DeLise AM et al., 2000, Cellular interactions and signaling in cartilage development, *Osteoarthritis Cartilage*, 8(5), 309-34

Shum L. and Nuckolls G., 2002, The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton, *Arthritis Res.*, 4(2), 94–106

Provot S. and Schipani E., 2005, Molecular mechanisms of endochondral bone development, *Biochem Biophys Res Commun.*, 328(3), 658-65

Kronenberg HM., 2003, Developmental regulation of the growth plate, *Nature*, 423(6937), 332-6

Buridan F. et al., 2009, Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate, *Folia Histochem Cytobiol.*, 47(1), 5-16

Goldring MB et al., 2006, The control of chondrogenesis, *J Cell Biochem.*, 97(1), 33-44

Mackie EJ. et al., 2008, Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton, *Int J Biochem Cell Biol.*, 40(1), 46-62.

Peach CA. et al., 2005, Recent advances in the genetic investigation of osteoarthritis, *TRENDS in Molecular Medicine*, 11(4), 186-191

Ulrich-Vinther M. et al., 2003, Articular cartilage biology, *J Am Acad Orthop Surg.*, 1(6), 421-30

Eyre D., 2002, Collagen of articular cartilage, *Arthritis Res.*, 4(1), 30-5

Martel-Pelletier J. et al., 2008, Cartilage in normal and osteoarthritis conditions, *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, 22(2), 351-84

- Buckwalter JA. and Mankin HJ., 1998, Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions, *Instr Course Lect.*, 47, 477-86
- Onyekwelu I. et al., 2009, Chondrogenesis, joint formation, and articular cartilage regeneration, *J Cell Biochem.*, 107(3), 383-92
- Sun MM. and Beier F., 2014, Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 102(1), 74-82
- Nagase H. and Kashiwagi M., 2003, Aggrecanases and cartilage matrix degradation, *Arthritis Res Ther.*, 5(2), 94-103
- Flannery CR. et al., 1999, Expression of ADAMTS homologues in articular cartilage, *Biochem Biophys Res Commun.*, 260(2), 318-22
- Rodríguez-Manzaneque JC. et al., 2002, ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors, *Biochem Biophys Res Commun.*, 293(1), 501-8
- Kuno K. et al., 2000, ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan, *FEBS Lett.*, 478(3), 241-5
- Fernandes JC. et al., 2002, The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology, *Biorheology.*, 39(1-2), 237-46
- Blaney Davidson EN. et al., 2007, TGF-beta and osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage.*, 15(6), 597-604
- Troeberg L. and Nagase H., 2012, Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis, *Biochim Biophys Acta.*, 1824(1), 133-45
- Cawston TE. and Young DA., 2010, Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown, *Cell Tissue Res.*, 339(1), 221-35
- Kevorkian L. et al., 2004, Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage, *Arthritis Rheum.*, 50(1), 131-41
- Pelletier JP. et al., 2001, Osteoarthritis, an Inflammatory Disease Potential Implication for the Selection of New Therapeutic Targets, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 44(6), 1237–1247
- Yudoh K. et al., 2005, Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function, *Arthritis Res Ther.*, 7(2), R380-91

Brandl A. et al., 2011, Oxidative stress induces senescence in chondrocytes, *J Orthop Res.*, 29(7), 1114-20

Dreier R., 2010, Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders, *Arthritis Res Ther.*, 12(5), 216

Gouttenoire J. et al., 2004, Modulation of collagen synthesis in normal and osteoarthritic cartilage, *Biorheology.*, 41(3-4), 535-42

Pfander D. et al., 2003, HIF-1 α controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes, *J Cell Sci.*, 116(9), 1819-26

Kirsch T. et al., 2000, Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, 8(4), 294-302

Pullig O. et al., 2000, Chondrocyte differentiation in human osteoarthritis: expression of osteocalcin in normal and osteoarthritic cartilage and bone, *Calcif Tissue Int.*, 67(3), 230-40

Murata M. et al., 2008, The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis?, *Osteoarthritis Cartilage.*, 16(3), 279-86

Felson DT. et al., 2000, Osteoarthritis: New Insights Part 1: The Disease and Its Risk Factors, *Ann Intern Med.*, 133, 635-646

Englund M et al., 2004, Association of Radiographic Hand Osteoarthritis With Radiographic Knee Osteoarthritis After Meniscectomy, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 50(2), 469–475

Doherty M et al., 1983, Influence of primary generalized osteoarthritis on development of secondary osteoarthritis, *Lancet.*, 2(8340), 8-11

Buckwalter JA. and Lane NE., 1997, Athletics and osteoarthritis, *Am J Sports Med.*, 25(6), 873-81

Bennell KL. et al., 2013, Update on the role of muscle in the genesis and management of knee osteoarthritis, *Rheum Dis Clin North Am.*, 39(1), 145-76

Messier SP. et al., 2009, The Intensive Diet and Exercise for Arthritis (IDEA) trial: design and rationale, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10:93

- Baker-LePain JC. And Lane NE., 2010, Relationship between joint shape and the development of osteoarthritis, *Curr Opin Rheumatol.*, 22(5), 538–543
- Grotle M et al., 2008, Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 9:132
- Jiang L et al., 2012, Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis, *Joint Bone Spine*, 79, 291–297
- Iliopoulos D et al., 2008, Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks, *PLoS ONE*, 3(11), e:3740
- McAlindon TE et al, 1996, DO ANTIOXIDANT MICRONUTRIENTS PROTECT AGAINST THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF KNEE OSTEOARTHRITIS?, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 39(4), 648-6656
- Srikanth VK. et al., 2005, A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis, *OsteoArthritis and Cartilage*, 13, 769e781
- Braga L. et al., 2009, Differences in radiographic features of knee osteoarthritis in African-Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project, *Osteoarthritis Cartilage*, 17(12), 1554–1561
- Jordan JM et al., 2007, Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project, *J Rheumatol.*, 34(1), 172-80
- Zhang Y et al., 2001, Comparison of the Prevalence of Knee Osteoarthritis Between the Elderly Chinese Population in Beijing and Whites in the United States The Beijing Osteoarthritis Study, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 44(9), 2065–2071
- Wang M. et al, 2011, Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis, *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES*, 1240 (2011), 61–69
- Zengini E. et al, 2016, The Genetic Epidemiological Landscape of Hip and Knee Osteoarthritis: Where Are We Now and Where Are We Going, *J Rheumatol.*, 43(2), 260-6
- Demissie S. et al., 2002, Genome scan for quantity of hand osteoarthritis: the Framingham Study, *Arthritis Rheum.*, 46(4), 946-52

- Hunter DJ. et al., 2004, A genome scan for joint-specific hand osteoarthritis susceptibility: The Framingham Study, *Arthritis Rheum.*, 50(8), 2489-96
- Leppävuori J et al., 1999, Genome scan for predisposing loci for distal interphalangeal joint osteoarthritis: evidence for a locus on 2q, *Am J Hum Genet.*, 65(4), 1060-7
- Stefánsson SE. et al., 2003, Genomewide Scan for Hand Osteoarthritis: A Novel Mutation in Matrilin-3, *Am J Hum Genet.*, 72(6), 1448–1459
- Reynard LN. and Loughlin J., 2013, The genetics and functional analysis of primary osteoarthritis susceptibility, *expert reviews in molecular medicine*, 15, e2
- Panoutsopoulou K. and Zeggini E., 2013, Advances in osteoarthritis genetics, *J Med Genet*, 50, 715–724
- Troeberg L and Nagase H, 2012, Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis, *Biochim Biophys Acta.*, 1824(1), 133-45
- Amin AR. and Islam AB., 2014, Genomic analysis and differential expression of HMG and S100A family in human arthritis: upregulated expression of chemokines, IL-8 and nitric oxide by HMGB1, *DNA Cell Biol.*, 33(8), 550-65
- Roberts SB. et al., 2015, Epigenetics of osteoarticular diseases: recent developments, *Rheumatol Int*, 35, 1293–1305
- Hyeonkyeong K. et al., 2015, Epigenetic Regulation of Chondrocyte Catabolism and Anabolism in Osteoarthritis, *Mol. Cells*, 38(8), 677-684
- Fernandez-Tajes J et al., 2014, Genomewide DNA methylation analysis of articular chondrocytes reveals a cluster of osteoarthritic patients, *Ann Rheum Dis*, 73, 668–677
- Rushton MD et al., 2014, Characterization of the cartilage DNA methylome in knee and hip osteoarthritis, *Arthritis Rheumatol*, 66, 2450–2460
- Jeffries MA et al., 2014, Genome-wide DNA methylation study identifies significant epigenomic changes in osteoarthritic cartilage, *Arthritis Rheumatol*, 66, 2804–2815
- Moazedi-Fuerst FC et al., 2014, Epigenetic differences in human cartilage between mild and severe OA, *J Orthop Res*, 32, 1636–1645
- den Hollander W et al., 2014, Knee and hip articular cartilage have distinct epigenomic landscapes: implications for future cartilage regeneration approaches, *Ann Rheum Dis*, 73, 2208–2212

- Loughlin J., 2015, Genetic contribution to osteoarthritis development: current state of evidence, *Curr Opin Rheumatol*, 27, 284–288
- Kouzarides T., 2007, Chromatin Modifications and Their Function, *Cell*, 128, 693–705
- Higashiyama R et al., 2010, Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis, *Mod Rheumatol*, 20(1), 11
- Lee RC. et al., 1993, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell.*, 75(5), 843-54
- Nugent M., 2016, MicroRNAs: exploring new horizons in osteoarthritis, *Osteoarthritis Cartilage*, 24(4), 573-80
- Miyaki S. and Asahara H., 2012, Macro view of microRNA function in osteoarthritis, *H. Nat. Rev. Rheumatol*, 8, 543–552
- Kozomara A. and Griffiths-Jones S., 2011, miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data, *Nucleic Acids Res.*, 39(Database issue):D152-7
- Li C. et al., 2009, Therapeutic MicroRNA Strategies in Human Cancer, *The AAPS Journal*, 11(4), 747-757
- Lee Y. et al, 2002, MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization, *EMBO J.*, 21(17), 4663-70
- Bartel DP., 2004, MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function, *Cell*, 116, 281–297
- Lee Y. et al., 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J*, 23(20), 4051–4060
- Cai X. et al., 2004, Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, *RNA*, 10(12), 1957-66
- Han J. et al., 2004, The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing, *Genes Dev*, 18(24), 3016-27
- Lund E. et al., 2004, Nuclear export of microRNA precursors, *Science*, 303(5654), 95-8
- Winter J. et al., 2009, Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nat Cell Biol*, 11(3), 228-34

- Calin GA. and Croce CM., 2006, MicroRNA signatures in human cancers, *Nat Rev Cancer*, 6(11), 857-66
- Esteller M., 2011, Non-coding RNAs in human disease, *Nat. Rev. Genet*, 12, 861–874
- Araldi E. and Schipani E., 2010, MicroRNA-140 and the silencing of osteoarthritis, *Genes Dev*, 24, 1075-1080
- Miyaki S. et al., 2009, MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses, *Arthritis Rheum*, 60(9), 2723–2730
- Yamashita S. et al., 2012, L-Sox5 and Sox6 proteins enhance chondrogenic miR-140 microRNA expression by strengthening dimeric Sox9 activity, *J Biol Chem*, 287(26), 22206-15
- Zhang R. et al., 2013, Molecular mechanisms of the cartilage-specific microRNA-140 in osteoarthritis, *Inflamm. Res*, 62, 871–877
- Yang J. et al., 2011, MiR-140 is co-expressed with Wwp2-C transcript and activated by Sox9 to target Sp1 in maintaining the chondrocyte proliferation, *FEBS Lett.*, 585(19), 2992-7
- Nakamura Y et al., 2012, Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage, *Appl Biochem Biotechnol*, 166(1), 64-71
- Tardif G. et al., 2009, Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human osteoarthritic chondrocytes, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 10, 148
- Tuddenham L. et al., 2006, The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells, *FEBS Letters*, 580, 4214–4217
- Pais H. et al., 2010, Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level, *RNA*, 16, 489–494
- Nakamura Y et al., 2011, Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 31(14), 3019–3028
- Nicolas FE. et al., 2011, mRNA expression profiling reveals conserved and non-conserved miR-140 targets, *RNA Biology*, 8(4), 607-615
- Miyaki S. et al., 2010, MicroRNA-140 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis, *Genes Dev.*, 24(11), 1173-85

- Liang ZJ et al., 2012, MiRNA-140 is a negative feedback regulator of MMP-13 in IL-1 β -stimulated human articular chondrocyte C28/I2 cells, *Inflamm Res.*, 61(5), 503-9
- Dole NS. and Delany AM., 2015, MicroRNA variants as genetic determinants of bone mass, *Bone*, 84, 57–68
- Duan R. et al., 2007, Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA, *Human Molecular Genetics*, 16(9), 1124–1131
- Saunders MA. et al., 2007, Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites, *PNAS*, 104(9), 3300–3305
- Mishra PJ. et al., 2008, MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics, *Cell Cycle*, 7(7), 853-858
- Arnold M et al., 2012, Cis-Acting Polymorphisms Affect Complex Traits through Modifications of MicroRNA Regulation Pathways, *PLoS ONE*, 7(5), e36694
- Luo X et al., 2011, A Functional Variant in MicroRNA-146a Promoter Modulates Its Expression and Confers Disease Risk for Systemic Lupus Erythematosus, *PLoS Genetics*, 7(6), e1002128
- Coronello C et al., 2012, Novel Modeling of Combinatorial miRNA Targeting Identifies SNP with Potential Role in Bone Density, *PLOS Computational Biology*, 8(12), e1002830
- Makris E., et al., 2011, The knee meniscus: Structure function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration, *Biomaterials* 32(2011), 7411-7431
- Li L. et al., 2010, Single Nucleotide Polymorphism Associated With Nonsyndromic Cleft Palate Influences the Processing of miR-140, *Am J Med Genet Part A*, 152A, 856–862
- Capdevila J. and Johnson RL., 1998, Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning, *Dev Biol.*, 197(2), 205-17
- Lu J. et al., 2014, Histone deacetylase 4 alters cartilage homeostasis in human osteoarthritis, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15, 438
- Nakamura Y. et al., 2011, Chondrocyte-Specific MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling, *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 31(14), 3019–3028

Papaioannou G. et al., 2015, MicroRNA-140 Provides Robustness to the Regulation of Hypertrophic Chondrocyte Differentiation by the PTHrP-HDAC4 Pathway, *Journal of Bone and Mineral Research*, 30 (6), pp 1044–1052

Chen W. et al., 2016, MicroRNA-381 Regulates Chondrocyte Hypertrophy by Inhibiting Histone Deacetylase 4 Expression, *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1377

Yiang X. et al., 2016, Mechanical and IL-1 Responsive miR-365 Contributes to Osteoarthritis Development by Targeting Histone Deacetylase 4, *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 436

Lu J. et al., 2014, Histone deacetylase 4 alters cartilage homeostasis in human osteoarthritis, *BMC Musculoskeletal Disorders*, 15, 438

Chang SF. et al., 2015, Upregulation of Bone Morphogenetic Protein-2 Synthesis and Consequent Collagen II Expression in Leptin-stimulated Human Chondrocytes, *PLoS One.*, 10(12), e0144252

Nicolas FE. et al., 2008, Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140, *RNA*, 14, 2513–2520

Liang Y. et al., 2016, E2 regulates MMP-13 via targeting miR-140 in IL-1 β -induced extracellular matrix degradation in human chondrocytes, *Arthritis Research & Therapy*, 18, 105

Genemaras A.A. et al., 2015, Early intervention with Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein modulates catabolic microRNA and mRNA expression in cartilage after impact injury, *Osteoarthritis and Cartilage* 23, 2036-2044

Li X. et al., 2016, MiR-29a and MiR-140 Protect Chondrocytes against the Anti-Proliferation and Cell Matrix Signaling Changes by IL-1 β , *Mol. Cells*, 39(2), 103-110